

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**FORMULACIÓN DE UN PRODUCTO BIOLÓGICO A BASE DE
Bacillus spp. PARA EL CONTROL DE LA MANCHA BACTERIANA
CAUSADA POR *Xanthomonas euvesicatoria* Y LA PROMOCIÓN
DEL CRECIMIENTO DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.)**

Por

M.C. JARED HERNÁNDEZ HUERTA


Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

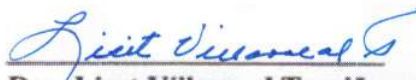
Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., Marzo 2021

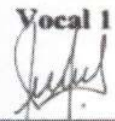
**FORMULACIÓN DE UN PRODUCTO BIOLÓGICO A BASE DE
Bacillus spp. PARA EL CONTROL DE LA MANCHA BACTERIANA
CAUSADA POR *Xanthomonas euvesicatoria* Y LA PROMOCIÓN
DEL CRECIMIENTO DEL CHILE (*Capsicum annum* L.)**

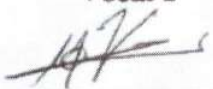
COMITÉ DE TESIS


Dra. Patricia Tamez Guerra
Director


Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Secretario


Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal 1


Dra. María Julissa Ek Ramos
Vocal 2


Dr. José Alberto Valadez Lira
Vocal 3


Dra. María del Rocío Infante Ramírez
Asesor externo


Dr. Loreto Robles Hernández
Asesor externo


Dra. Katiuhka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



**FORMULACIÓN DE UN PRODUCTO BIOLÓGICO A BASE DE
Bacillus spp. PARA EL CONTROL DE LA MANCHA BACTERIANA
CAUSADA POR *Xanthomonas euvesicatoria* Y LA PROMOCIÓN
DEL CRECIMIENTO DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.)**

DIRECCIÓN DE TESIS



Dra. Patricia Tamez Guerra

Director



Dra. María del Rocío Infante Ramírez

Asesor externo



Dr. Loreto Robles Hernández

Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mi directora de tesis doctoral, la Dra. Patricia Tamez Guerra, por el apoyo que ha brindado al desarrollo de este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por su dirección que ha facilitado la investigación. Gracias por la confianza otorgada desde que inicié mi formación en la Universidad Autónoma de Nuevo León. Asimismo, agradezco a mi codirectora la Dra. María de Rocio Infante Ramírez su dedicación y guía durante el desarrollo de este trabajo. Gracias por la confianza y apoyo otorgados desde antes de iniciar el doctorado, ya que gracias a ella me decidí estudiar en esta Universidad.

Por otra parte, quiero agradecer el apoyo otorgado por los integrantes y encargados de los laboratorios de Biotecnología II de la Facultad de Ciencias Químicas, el Laboratorio de Microbiología Aplicada, Fitopatología y Fisiología Poscosecha de la Facultad de Ciencias Agrotecnológicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua y el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. En especial a la Dra. Carmen Elisabeth Delgado Gardea, la Q.B.P. Margarita Sofía García Madrid y el Dr. Alonso Alberto Orozco Flores por su apoyo en la realización de este trabajo. Así también, agradezco al Dr. Jorge Alfonso Jiménez Castro de la Universidad Autónoma de Chihuahua, por su orientación y atención a mis consultas sobre análisis estadísticos.

Además, agradezco a mis asesores el Dr. Ricardo A. Gómez Flores, la Dra. Licet Villarreal Treviño, la Dra. María Julissa Ek Ramos, el Dr. José Alberto Valadez Lira y mi asesor externo el Dr. Loreto Robles Hernández, por la revisión cuidadosa que han realizado de este documento y sus valiosas sugerencias en momentos de duda.

Gracias a mis amigos, que siempre me han apoyado en los momentos difíciles de este trabajo, en especial al M.C. Aldo Gutiérrez Chávez por su apoyo moral y humano. Finalmente, gracias a mi familia por su amor, reconocimiento y apoyo que permiten mi crecimiento como persona y como profesionista.

DEDICATORIA

A mis padres María de la Luz y Juan Antonio por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ellos, incluyendo este.

Gracias, madre y padre.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Importancia económica del cultivo.....	3
2.2. Mancha bacteriana en el cultivo de chile.....	3
2.2.1. Ciclo de la enfermedad	4
2.3. Control de la enfermedad.....	5
2.3.1. Control cultural	5
2.3.2. Control químico	6
2.3.3. Control biológico	7
2.4 Género <i>Bacillus</i>	8
2.4.1. Taxonomía	8
2.4.2. Características morfológicas.....	8
2.4.3. Ecología y ciclo de vida.....	9
2.5 Mecanismos de control biológico de <i>Bacillus</i> spp.....	10
2.5.1 Directos.....	10
2.5.2 Indirectos	11
III. JUSTIFICACIÓN	12
IV. HIPÓTESIS	13
V. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general.....	14
5.2 Objetivos específicos	14
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
6.1 Monitoreo de enfermedades del chile	15
6.2 Aislamiento e identificación del patógeno.....	16
6.2.1. Aislamiento del patógeno	17
6.2.2 Identificación del patógeno.....	18
6.2.2.1 Identificación fenotípica	18
6.2.2.2 Identificación molecular	18
6.3. Pruebas de patogenicidad y virulencia.....	20
6.4. Susceptibilidad de <i>Xanthomonas</i> a antimicrobianos	21

6.5. Detección de genes de resistencia al cobre	23
6.6. Aislamiento e identificación de <i>Bacillus</i> spp.....	24
6.6.1. Colecta de muestras	24
6.6.2. Aislamiento	24
6.6.3 Identificación de <i>Bacillus</i> spp.....	25
6.6.3.1 Identificación fenotípica	25
6.6.3.2 Identificación molecular	25
6.7. Confrontación directa <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> vs. <i>Xanthomonas</i> spp.	27
6.8 Biocontrol de la mancha bacteriana en condiciones controladas	27
6.8.1. Inducción de resistencia a <i>Xanthomonas</i>	28
6.8.2. Biocontrol foliar directo de <i>Xanthomonas</i>	29
6.9. Biocontrol de la mancha bacteriana en condiciones de invernadero	30
6.10. Promoción del crecimiento en plántulas de chile	32
6.11. Promoción del crecimiento en plantas de chile con formulados	33
6.11.1. Preparación del formulado.....	33
6.11.2. Promoción de crecimiento en plántulas	33
6.11.3. Promoción de crecimiento en plantas jóvenes	34
6.12. Análisis estadísticos	35
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
7.1. Monitoreo de enfermedades en el cultivo de chile	36
7.1.1 Marchitez del chile.....	36
7.2 Agente causal de la mancha bacteriana	42
7.2.2 Mancha bacteriana	36
7.2.3 Virosis	37
7.2.4 Cenicilla	38
7.2.5 Severidad de las enfermedades	40
7.3 Caracterización molecular del agente causal	43
7.4 Pruebas de patogenicidad y virulencia.....	44
7.5. Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos	47
7.6. Detección de genes de resistencia al cobre	49
7.7. Aislamiento e identificación de bacterias del género <i>Bacillus</i>	50

7.8. Caracterización molecular de <i>Bacillus</i>	51
7.9. <i>Bacillus</i> spp. como promotores del crecimiento vegetal	51
7.10. Confrontación directa <i>in vitro</i> de <i>Bacillus</i> vs. <i>Xanthomonas</i> spp.	54
7.11. Biocontrol de la mancha bacteriana en condiciones controladas	55
7.12. Biocontrol de la mancha bacteriana en condiciones de invernadero	61
7.13. Promoción del crecimiento en plántulas de chile jalapeño en condiciones de invernadero por formulados de <i>Bacillus</i> sp.	64
7.14. Promoción de crecimiento en chile jalapeño en condiciones de invernadero por formulados de <i>Bacillus</i> sp.	68
VIII. CONCLUSIONES	78
X. BIBLIOGRAFÍA	80

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Primers usados para identificar el agente causal de la mancha bacteriana en chile.	20
Tabla 2. Primers usados para identificar genes de resistencia al cobre <i>CopLAB</i> en <i>Xanthomonas</i> spp.	23
Tabla 3. Primers usados para la identificación de especies de <i>Bacillus</i>	26
Tabla 4. Análisis de regresión logística binaria del comportamiento de la incidencia de enfermedades en seis variedades de chile jalapeño durante ocho monitoreos.	39
Tabla 5. Comportamiento de severidad de enfermedades en seis variedades de chile jalapeño durante el ciclo agrícola 2017, Meoqui, Chihuahua.	41
Tabla 6. Análisis de la severidad de aislamientos de <i>Xanthomonas perforans</i> y <i>X. euvesicatoria</i> en plántulas de chile Jalapeño variedad Grande.	46
Tabla 7. Susceptibilidad de cepas de <i>Xanthomonas</i> asociadas con la mancha bacteriana del chile a compuestos a base de cobre, oxitetraciclina y gentamicina.	48
Tabla 8. Análisis de conglomerados de la promoción del crecimiento de plántulas de chile inoculadas con aislamientos de <i>Bacillus</i> spp. al día 40 después de la inoculación.	52
Tabla 9. Inhibición de la mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> y <i>X. peroforas</i> en plantas de chile por aislamientos de <i>Bacillus</i> sp. bajo condiciones controladas.	58

Tabla 10. Efecto de formulados biológicos de <i>Bacillus</i> sp. en parámetros vegetativos de plántulas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.	65
Tabla 11. Efecto de formulados biológicos de <i>Bacillus</i> sp. en pigmentos fotosintéticos en plántulas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.	66
Tabla 12. Efecto de formulados biológicos de <i>Bacillus</i> sp. en parámetros vegetativos de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.	69
Tabla 13. Efecto de formulados biológicos de <i>Bacillus</i> sp. en biomasa de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.	70
Tabla 14. Efecto de formulados biológicos de <i>Bacillus</i> sp. en floración y fructificación de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.	71
Tabla 15. Efecto de formulados biológicos de <i>Bacillus</i> sp. en pigmentos fotosintéticos de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Ciclo de vida de la mancha bacteriana en chile causada por <i>Xanthomonas</i> spp.	5
Figura 2. Principales mecanismos de control biológico del género <i>Bacillus</i> .	11
Figura 3. Mapa de lotes comerciales de chile jalapeño en la colonia Lázaro Cárdenas, Municipio de Meoqui, Chihuahua.	16
Figura 4. Mapa de lotes de chile jalapeño donde se recolectaron muestras de plantas y suelo, en la región de Lázaro Cárdenas, Municipio de Meoqui, Chihuahua.	17
Figura 5. Dinámica del comportamiento de enfermedades en seis variedades de chile jalapeño durante el ciclo agrícola 2017, Meoqui, Chihuahua.	38
Figura 6. Morfología colonial de <i>Xanthomonas perforans</i> (Xp) y <i>X. euvesicatoria</i> (Xe).	42
Figura 7. Identificación molecular de <i>Xanthomonas</i> spp. por PCR.	44
Figura 8. Síntomas inducidos por aislamientos de <i>Xanthomonas</i> en hojas de chile jalapeño a los 10 días después de inoculación.	45
Figura 9. Detección de genes de resistencia al cobre en <i>Xanthomonas</i> spp. por PCR	49
Figura 10. Morfología macroscópica y microscópica de cepas de <i>Bacillus</i> crecidas en medios de agar nutritivo encubadas por 48 horas.	50
Figura 11. Identificación molecular de <i>Bacillus</i> spp. por PCR.	51

Figura 12. Efecto de aislamientos de <i>Bacillus</i> sp., en plántulas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.	53
Figura 13. Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de aislamientos de <i>Xanthomonas</i> spp. por aislamientos de <i>Bacillus</i> spp.	54
Figura 14. Inhibición de la mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (a) y <i>X. peroforas</i> (b) en plantas de chile por aislamientos de <i>Bacillus</i> sp. bajo condiciones controladas	56
Figura 15. Inhibición de la mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> y <i>X. peroforas</i> en plantas de chile por aislamientos de <i>Bacillus</i> sp. como inductores de resistencia bajo condiciones controladas.	57
Figura 16. Inhibición de la mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> y <i>X. peroforas</i> en plantas de chile por aislamientos de <i>Bacillus</i> sp. bajo condiciones controladas.	59
Figura 17. Inhibición de la mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> (a) y <i>X. peroforas</i> (b) en plantas de chile por aislamientos de <i>Bacillus</i> sp. bajo condiciones de invernadero.	62
Figura 18. Inhibición de la mancha bacteriana causada por <i>Xanthomonas euvesicatoria</i> y <i>X. peroforas</i> en plantas de chile por aislamientos de <i>Bacillus</i> sp. bajo condiciones de invernadero.	63
Figura 19. Gráfica de componentes principales (CP1y CP2) de parámetros vegetativos de plántulas de chile inoculadas con formulados a base de <i>Bacillus</i> spp.	67
Figura 20. Efecto de formulados biológicos de <i>Bacillus</i> sp., en plántulas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.	68
Figura 21. Gráfica de componentes principales (CP1y CP2) de parámetros vegetativos de plantas de chile inoculadas con formulados a base de <i>Bacillus</i> spp.	73

Figura 22. Efecto de formulados biológicos de *Bacillus* sp., en plantas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero. 74

RESUMEN

La mancha bacteriana del chile causada por *Xanthomonas* spp., es una enfermedad que reduce la calidad y el rendimiento del cultivo. Esta enfermedad se controla mediante el uso de compuestos a base de cobre o antibióticos, pero el patógeno se ha hecho resistente a ambos. Para reducir este riesgo, es importante buscar nuevos métodos, como el control biológico. En el presente estudio se evaluó la efectividad de aislamientos de *Bacillus* spp. como agentes de biocontrol de la mancha bacteriana y como promotores de crecimiento del chile. Para lograrlo, se aislaron, identificaron y caracterizaron bioquímica y molecularmente a *Xanthomonas* asociadas a la mancha bacteriana, donde *X. euvesicatoria* y *X. perforans* reconocida actualmente como *X. euvesicatoria*, fueron los agentes causales de esta enfermedad en chile jalapeño. A los más virulentos se les realizaron pruebas de patogenicidad y susceptibilidad a compuestos a base de cobre (Cu) oxitetraciclina (Ox) y gentamicina (Gen); todos fueron resistentes a Cu, pero susceptibles a Cu + Ox y Gen + Ox y Gen. También se detectaron genes *copLAB* en todos menos un aislamiento, mediante análisis de PCR. Además, se aislaron, identificaron y caracterizaron especies de *Bacillus* [*B. cereus* (Bc) y *B. thuringiensis* (Bt)] y se determinó su antagonismo *in vitro* e invernadero contra *X. euvesicatoria*, con ellos se elaboraron formulados para determinar su potencial como promotores de crecimiento en plantas de chile en invernadero. Las cepas Bc26, Bc8 y Bt24 inhibieron el desarrollo de la enfermedad y los formulados a base de estos aislados, promovieron el crecimiento de plántulas y plantas jóvenes en condiciones de invernadero. En conclusión, aislamientos de *B. cereus* y *B. thuringiensis* obtenidos de suelo, podrían emplearse para el manejo integrado de la mancha bacteriana en chile jalapeño causada por *X. perforans* y *X. euvesicatoria*, para reducir la severidad de la enfermedad, y como biofertilizante de chile en plántulas o cultivo en invernadero.

ABSTRACT

Pepper bacterial spot caused by *Xanthomonas* spp., is a disease that reduces the crop quality and yield. This disease is controlled by using copper-based compounds or antibiotics, but the pathogen has become resistant to both. To reduce this risk, it is important to seek new methods, such as biological control. In the present study, the effectiveness of *Bacillus* spp. as bacterial spot biocontrol agents and as growth promoters of pepper was evaluated. To achieve this, *Xanthomonas* associated with bacterial spot were isolated, identified, and biochemically and molecularly characterized, where *X. euvesicatoria* and *X. perforans* currently *X. euvesicatoria* were the causal agents of this disease in jalapeño pepper. The most virulent were tested for pathogenicity and susceptibility to compounds based on copper (Cu), oxytetracycline (Ox), gentamicin (Gen). All were resistant to Cu, but susceptible to Cu + Ox and Gen + Ox and Gen. *CopLAB* genes were also detected in all but one isolate, by PCR analysis. In addition, *Bacillus* species [*B. cereus* (Bc) and *B. thuringiensis* (Bt)] and their antagonism *in vitro* and greenhouse against *X. perforans* and *X. euvesicatoria* were determined. Formulations were elaborated using them to determine their potential as growth promoters in greenhouse chili plants. Bc26, Bc8 and Bt24 strains inhibited this disease development, and those formulated based on these isolates, promoted the growth of seedlings and young plants under greenhouse conditions. In conclusion, *B. cereus* and *B. thuringiensis* isolates obtained from soil could be used for the bacterial spot, caused by *X. perforans* and *X. euvesicatoria*, integrated management on jalapeño pepper, to reduce this disease severity, and as pepper biofertilizer for seedlings or greenhouse cultivation.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de chile (*Capsicum annum* L.) es uno de los cultivos cuya actividad es muy importante en México. En el 2019 se sembraron 158,913.16 has y se produjeron 3,379,289 ton de chile, con un valor económico de \$ 30,063 mil millones de pesos, lo que colocó a México como el segundo productor a nivel mundial (SIAP 2019). Los estados con mayor producción son Sinaloa, Chihuahua, Zacatecas, San Luis Potosí. Chihuahua es uno de los estados con mayor producción con 676,463 tons (SIAP 2019). Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrentan los productores, son los problemas fitosanitarios. El cultivo se ve afectado por diversas enfermedades, siendo la mancha bacteriana, una de las más importantes. Esta enfermedad es causada por especies de *Xanthomonas euvesicatoria*, *perforans*, *vesicatoria* y *gardneri*, y se presenta todos los años (López y González 2001). Cabe aclarar que, aunque hay pruebas moleculares para distinguir entre las especies de *X. euvesicatoria* de *X. perforans* en las cuales se basó este estudio, reportes recientes indican que se trata de la misma especie, es decir, *X. perforans* es filogenéticamente igual a *X. euvesicatoria*.

El manejo principal de esta enfermedad es mediante el uso de compuestos a base de cobre o antibióticos (Keinath 2019), pero el patógeno se ha hecho resistente a ellos (Hamza et al. 2010; Abbasi et al. 2015; Griffin et al. 2017; Areas et al. 2018; Strayer-Scherer et al. 2018). Por otro lado, el uso inadecuado de estos productos químicos causa contaminación ambiental. Actualmente se están tomando en cuenta nuevas alternativas para el control de plagas y enfermedades en los cultivos debido al fuerte impacto que han tenido los agroquímicos sobre la salud tanto de aplicadores como de los consumidores; contaminación de los recursos ambientales; generación de poblaciones de patógenos resistentes a los principios activos utilizados y falta de un control eficiente. Una alternativa ecológica es el empleo de agentes de control biológico que puede ser económico y aceptable para la mayoría de los cultivos. Este tipo de control ofrece ventajas como: la especificidad en su actuación, los patógenos tienden a no desarrollar resistencia a productos microbianos y es respetuosos con el medio ambiente.

El uso de *Bacillus* como agente de control biológico ha demostrado ser eficaz en el control de especies del género *Xanthomonas* en otros cultivos (Shine et al. 2018;

Tunsagool et al. 2019). El mecanismo por el cual algunas especies de *Bacillus* actúa como agente de control es a través de la producción de metabolitos secundarios, competencia por espacio y la generación de resistencia en su hospedero (Shafi et al. 2017). Por lo anterior, en este proyecto se plantea producir un formulado a partir de bacterias del género *Bacillus* para el control del agente causal de la mancha bacteriana y la promoción de crecimiento en el cultivo de chile.

II. ANTECEDENTES

2.1 Importancia económica del cultivo

El cultivo de chile jalapeño es considerado a nivel mundial como una de las cinco hortalizas más importantes (Castellón-Martínez et al. 2012). En México, este cultivo genera una gran actividad agrícola debido a su consumo, alta rentabilidad y gran demanda de mano de obra. En el 2018 se registró una superficie sembrada de 158,913.16 has, generando una producción de 3,379,289 toneladas, con un valor de producción de \$ 30,063 mil millones de pesos (SIAP 2019).

De los estados productores de chile en México, Chihuahua ocupa el segundo lugar en producción con una aportación de 676,463 toneladas y una superficie sembrada de 26,933.32 (SIAP 2019). Sin embargo, las enfermedades bióticas afectan la productividad del cultivo (López y González 2001). Las enfermedades que afectan al cultivo pueden presentarse en diferentes partes de la planta, desde enfermedades radiculares causadas por *Rhizoctonia* spp., *Alternaria* spp., *Phytophthora capsici* y *Fusarium* spp. (Aguilar-Rincón 2012) y en el follaje como la cenicilla causada por el hongo *Oidiopsis taurica* (Agrios 2005); así mismo, pueden ser causadas por virus como PVY, TbRV y CMV (González-Franco et al. 2014) o bacterias como la mancha bacteriana causada por varias razas de *Xanthomonas*; no obstante esta última es considerada como una de las principales amenazas bacterinas para la sanidad del cultivo (López y González 2001), donde el género de *Xanthomonas* es el de mayor importancia por su impacto económico en el cultivo. Esta bacteria es la causante de la mancha bacteriana en el cultivo de chile (Agrios 2005).

2.2 Mancha bacteriana en el cultivo de chile

Esta enfermedad es causada por cuatro especies del género *Xanthomonas* (*euvesicatoria*, *perforans*, *vesicatoria* y *gardneri*), son bacterias de tipo bacilo aeróbico con dimensiones de 0.6 a 0.7 µm de diámetro y de 1.0 a 1.7 µm de longitud, son bacterias Gram negativa, móvil a base de un flagelo polar (Potnis et al. 2015); sus principales hospederos son el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y chile (*Capsicum annum* L.)

(EPPO 2013). La enfermedad se generaliza e intensifica, bajo condiciones de alta humedad principalmente con precipitaciones constantes. El ambiente húmedo y la temperatura entre 25 y 30 °C, con un óptimo de 27 °C favorecen el desarrollo de la enfermedad. La enfermedad se disemina por el viento y por salpicaduras de lluvia; se introduce en las plantas a través de las aperturas naturales como lenticelas y estomas en hojas y frutos o por medio de heridas. La bacteria puede sobrevivir por 3 ó 6 meses en el suelo en plantas de chile o en malezas que persisten en los campos de cultivo por más de 12 meses (Agrios 2005, An et al. 2019).

2.2.1 Ciclo de la enfermedad

La sintomatología característica de la mancha bacteriana se presenta en las hojas y en los tallos en forma de manchas circulares o irregulares, de un tamaño de 4 mm, las manchas son translúcidas y de consistencia acuosa, a medida que la mancha se desarrolla se vuelve de color gris-púrpura con el centro oscuro y rodeada de un halo amarillo. Cuando la enfermedad es muy severa puede llegar a defoliar completamente a la planta (Potnis et al. 2015).

El ciclo de la enfermedad se da en tres fases, saprofítica, epifítica y patogénica. En la primera las bacterias que viven en semillas y hospederos alternativos se multiplican y colonizan en plantas jóvenes; en la segunda es una fase epifítica en donde las bacterias inician la invasión sobre la superficie foliar y en la tercera es una fase patogénica que es cuando se desarrolla la enfermedad. En esta última fase la bacteria entra a la planta, invade las células, se multiplica y se dispersa a otras plantas (An et al. 2019) (Figura 1). La enfermedad produce una reducción en el crecimiento de la planta y la disminución de la producción (Velásquez-Valle et al. 2014). Diversos reportes indican que la mancha bacteriana puede causar pérdidas económicas mayores al 50% por un aumento en la defoliación de la planta y la presencia de manchas en los frutos, reduciendo su calidad y comercialización (Fayette et al. 2012).

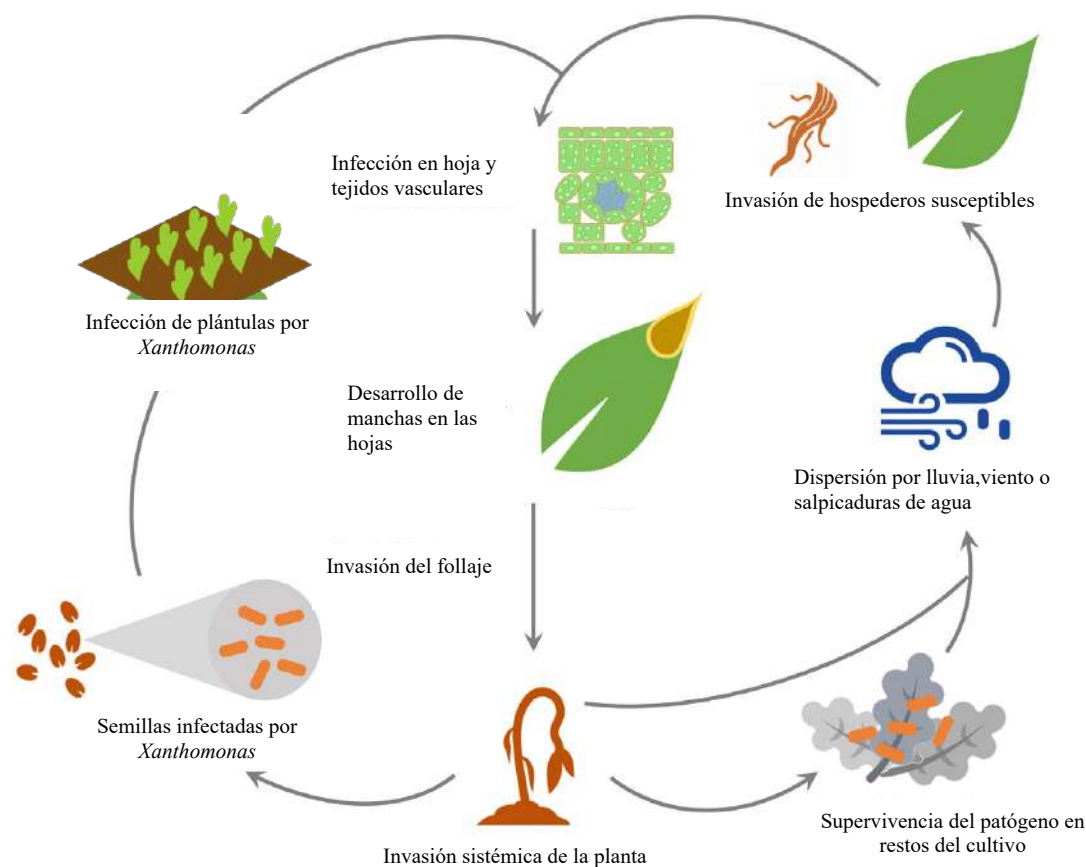


Figura 1. Ciclo de vida de la mancha bacteriana en Chile causada por *Xanthomonas* spp. Tomado de An et al. (2019).

2.3 Control de la enfermedad

La mancha bacteriana es difícil de controlar debido a su alta variabilidad patogénica y a la ineficiencia del control químico (Areas et al. 2018). La dificultad en el control se intensifica en sitios donde las condiciones de temperatura y humedad aceleran el desarrollo de la enfermedad y además el control es limitado cuando la resistencia del hospedero es inefectiva (Worthington et al. 2012).

2.3.1 Control cultural

El empleo de semilla libre del patógeno es una estrategia de control cultural. Alternativamente, existen tratamientos químicos como el hipoclorito de sodio, el peróxido

de hidrógeno, el acetato cúprico acidulado en caliente o el sulfato de zinc, pero ningún tratamiento es totalmente efectivo (Vicente y Holub 2013). Así mismo, son recomendadas la rotación de cultivos, la eliminación de malezas y plantas hospederas, el ajuste de las fechas de siembra a fin de evitar las condiciones óptimas de desarrollo de la enfermedad (Potnis et al. 2015). Igualmente, el cuidado en la nutrición de las plantas y la desinfección de herramientas, equipo de trabajo y maquinaria son importantes medidas fitosanitarias importantes (Rombouts 2017).

2.3.2 Control químico

El uso de cobre ha sido común en el control de la mancha bacteriana en Chile (Vallad et al. 2010). Aunque se ha observado resistencia de la bacteria a la aplicación de compuestos cúpricos como sulfato de cobre, hidróxido de cobre y oxiclورو de cobre, también se reporta sensibilidad de *Xanthomonas* spp. a la mezcla de cobre con fungicidas ditiocarbamatos (Areas et al. 2017). La aplicación de cobre en combinación con maneb y mancozeb han sido los principales químicos en el control de la mancha bacteriana en Chile (Ju-Hee et al. 2015). Ignjatov et al. (2010) sugirieron que *Xanthomonas* spp. posee genes de resistencia al cobre ubicados en los plásmidos y que son transferidos a cepas sensibles por medio de conjugación, resultando así, cepas resistentes. La resistencia se agudiza con el uso intensivo que se ha dado a los fungicidas cúpricos. Una estrategia interesante para mejorar el control de *Xanthomonas* spp. es el desarrollo de compuestos que permiten eludir los mecanismos de resistencia del patógeno, con el objetivo de reutilizar los reactivos de control típicos como el cobre. El compuesto 2-aminoimidazol (2AI), un análogo del producto natural marino oroidina, ha sido registrado por su capacidad para suprimir la resistencia de varias cepas bacterianas, posiblemente al impedir la formación de biopelículas bacterianas (Worthington et al. 2012). Otros productos químicos que han mostrado alta efectividad en el control de *Xanthomonas* son fluazinam, oxitetraciclina y acibenzolar-S-metil (ASM). El ASM participa en la inducción de resistencia en planta (Terumi et al. 2015).

2.3.3 Control biológico

El uso de control biológico para la supresión consistente de enfermedades causadas por bacterias ha sido difícil (Hert et al. 2009). El control biológico de diferentes especies de *Xanthomonas* incluye el uso de microorganismos con potencial antagonico, de compuestos bioactivos obtenidos mediante extractos de plantas, de extractos de microorganismos y de bacteriófagos.

Entre los mecanismos de acción más comunes dentro del antagonismo se encuentra la antibiosis, la competencia y el hiperparasitismo (Leelavathi et al. 2014). El potencial de hongos y bacterias para colonizar plantas de manera endofítica es una característica importante en el control biológico (Ji et al. 2014).

El uso de bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB) es una alternativa prometedora que permite reducir enfermedades y favorecer el crecimiento vegetal (Yim et al. 2014; Li et al. 2015; Chandrasekaran et al. 2017). Las especies de *Bacillus* han sido ampliamente estudiadas en el biocontrol por producir endosporas, antibióticos y enzimas líticas resistentes a condiciones adversas (Lanna et al. 2013). Igualmente, *Bacillus* spp. induce la resistencia sistémica en plantas permitiendo la activación de mecanismos de defensa (Chandrasekaran et al. 2017). Mirik et al. (2008) reportaron una disminución de la mancha bacteriana de un 38 a 67% al utilizar cepas de *Bacillus* spp. Otros experimentos de campo han mostrado la efectividad biológica de *B. subtilis*, *Penicillium chrysogenum*, *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* en el control de *X. vesicatoria* al reducir la severidad de la infección. *Streptomyces lydicus* es otro microorganismo conocido por suprimir la mancha bacteriana en chile. Robles et al. (2017) reportaron una inhibición de 9 a 100% de la enfermedad en condiciones *in vitro*, atribuyendo el control a la activación de mecanismos de defensa en planta. Las hojas de plantas infectadas con *X. vesicatoria* y tratadas con agentes de biocontrol, muestran un alto contenido de fenoles y vitamina C, además, se observa mayor actividad de quitinasa, peroxidasa y polifenoloxidasas en comparación con las hojas de chile infectadas y no tratadas (Queiroz et al. 2008). Estas enzimas participan en los mecanismos de defensa de la planta ya sea formando barreras y reforzando la estructura celular o bien participando en la inducción de resistencia (Hassan y Zyton 2017).

2.4 Género *Bacillus*

El botánico alemán Ferdinand Cohn (1828-1898) fue el primero en describir el género *Bacillus*, exhibiéndolo como uno de los microorganismos más resistentes al calor gracias a la formación de endosporas bacterianas (Madigan et al. 2003). En la actualidad existen múltiples reportes del potencial antagónico de distintas especies de *Bacillus* frente a patógenos de plantas. Dicho potencial se debe a la capacidad de producir una amplia gama de moléculas bioactivas que poseen importantes propiedades antimicrobianas, de baja toxicidad y alta biodegradabilidad (Yanti y Nasution 2017; Chen et al. 2020). El género ha sido estudiado por su capacidad de promover el crecimiento vegetal en distintos cultivos de importancia agrícola.

2.4.1 Taxonomía

El género *Bacillus* pertenece al reino bacteria, al filo Firmicutes, a la clase Bacilli, a la orden Bacillales y a la familia Bacillaceae (Ñacato y Valencia 2016). El género incluye una amplia gama de especies, muchas de las cuales tienen gran importancia en la industria farmacéutica, textil, cosmetológica y en sector agrícola (Liu et al. 2013). Muchas de las especies de *Bacillus* son saprófitas; no obstante, algunas más son patógenas, como es el caso de *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. circulans* y *B. licheniformis* (Logan y De Vos 2015). Las diferentes especies del género son aisladas de todo tipo de hábitats, incluyendo los marinos y difieren en características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas; en la composición del ADN y en los requerimientos nutricionales. La taxonomía del género implica dos estudios: las características fenotípicas y el estudio genético (Dickinson et al. 2004).

2.4.2 Características morfológicas

Bacillus es una bacteria Gram positiva, catalasa-positiva, aerobia estricta, capaz de producir endosporas resistentes. Las células bacterianas tienen forma bacilar con el extremo generalmente curvo. El tamaño de las células varía de 0.4 a 1.8 μm de diámetro y de 0.9 a 10.0 μm de longitud. Las variaciones de tamaño entre células de una misma especie son mínimas. La forma de las endosporas depende de la especie; sin embargo, las

formas más comunes son ovaladas o elipsoidales. La posición de las endosporas también varía, pudiendo ser central, paracentral, subterminal o terminal (Logan y De Vos 2015). Las endosporas producidas por la bacteria son capaces de resistir la exposición a altas temperaturas, agentes químicos agresivos, desecación, desinfectantes, radiación y ácidos; además son estructuras difíciles de destruir (Tejera et al. 2011). La endospora contiene un cromosoma condensado e inactivo en su interior, el cual está protegido por diversas capas de estructura proteica, además de una corteza rica en peptidoglicano (Madigan et al. 2003). La morfología colonial de *Bacillus* depende de la composición del medio y de las condiciones de incubación, normalmente, las colonias son muy variables dependiendo también de la especie, pero pueden distinguirse con facilidad. En general, son característicamente grandes, varían de forma circular a irregular, con bordes enteros a ondulados, con texturas mate a granulares, o bien, suaves, brillantes y húmedas. Los colores coloniales varían de color gris claro o cremoso a blanquecino (Logan 2015).

2.4.3 Ecología y ciclo de vida

El ciclo de vida de la bacteria se divide en dos fases: la fase de crecimiento vegetativo y la fase de esporulación. Cuando las condiciones ambientales son favorables se desarrolla la fase vegetativa, la cual se caracteriza por permitir un crecimiento exponencial (An et al. 2019). Cuando los nutrientes críticos se encuentran limitados, la bacteria inicia la fase de esporulación, en esta se da la formación de endosporas capaces de sobrevivir en medios poco favorables. Si las condiciones ambientales mejoran, las endosporas germinan e inicia nuevamente la fase de crecimiento vegetativo (Tejera et al., 2011).

La formación de la endospora inicia con la condensación del material genético dentro de la célula vegetativa, después de la formación de la pre-espora, se presenta la invaginación, posteriormente aparece el exósporio. En la siguiente fase ocurre la incorporación del calcio, la deshidratación, la producción de ácido dipicolínico y de proteínas ácido-solubles, así como la formación de la capa cuticular. La maduración, incluye el desarrollo de la resistencia. Finalmente, ocurre la lisis celular y la liberación de la endospora. La endospora tiene la capacidad de permanecer en latencia por largos periodos. La transición de endospora a célula vegetativa incluye tres procesos: la

activación, la germinación y el crecimiento. La activación se presenta cuando las endosporas son expuestas a temperaturas elevadas por varios minutos; cuando el medio contiene los nutrientes necesarios, sucede la germinación. El crecimiento se caracteriza por la acumulación de agua en la célula, lo cual da lugar al hinchamiento visible, seguido de la ruptura de la cubierta, la emergencia y división de las células vegetativas (Madigan et al. 2003; An et al. 2019).

2.5 Mecanismos de control biológico de *Bacillus* spp.

2.5.1 Directos

Bacillus spp. tiene potencial para sintetizar diversos metabolitos secundarios y compuestos bioactivos que presentan propiedades antimicrobianas. Se han registrado cerca de 2428 péptidos con propiedades antimicrobianas (Azizoglu 2019). Las especies de *Bacillus* pueden sintetizar varios lipopéptidos anfifílicos y tensoactivos con actividad antimicrobiana específica contra ciertos patógenos. Los lipopéptidos pueden clasificarse en dos subgrupos: los péptidos cíclicos como la iturina y las macrolactonas, como la fengicina y la surfactina. La iturina provoca la fuga citoplasmática al crear poros en la membrana celular (Maget et al. 1985). El mecanismo de acción más estudiado de la antibiosis de *B. subtilis* es el efecto de la iturina con fuerte actividad biocida contra un amplio rango de patógenos de suelo, foliares y de poscosecha (Jouzani et al. 2017). Las surfactinas y las fengicinas, solas o en sinergismo, actúan como inductores de defensa en plantas (Ongena et al. 2008). Los componentes principales de la resistencia sistémica inducida (ISR) son los compuestos fenólicos, las modificaciones genéticas y estructurales, los activadores de resistencia de las plantas y la activación de armas enzimáticas. *Bacillus* produce importantes enzimas líticas como las quitinasas, proteasas o celulasas que ayuda al control de hongos y bacterias mediante la degradación de la pared celular de estos microorganismos (Sicúa et al. 2015) (Figura 2).

B. subtilis se conoce como una bacteria poco competitiva en la rizósfera. Sin embargo, la competencia por hierro es un rasgo esencial antagónico de las bacterias contra patógenos de plantas (Yu et al. 2011). Las plantas tienen la capacidad de detectar ciertos compuestos volátiles presentes en su ambiente y responder a ellos, como consecuencia hay una regulación en el crecimiento de las plantas y en la inducción de resistencia. Así

mismo, los compuestos volátiles producidos por *Bacillus* incrementan la fotosíntesis y regulan el contenido endógeno de fitohormonas, alterando la transcripción de genes involucrados en la producción de auxinas, giberelinas, citocininas y etileno. El albuterol y el 1,3-propanodiol son compuestos volátiles producidos por *B. subtilis* considerados como factores clave en la promoción de crecimiento vegetal (Villareal-Delgado et al. 2018).

2.5.2 Indirectos

Bacillus spp. es reconocida por su potencial para promover el crecimiento vegetal. La síntesis de fitohormonas juega un papel importante dentro de este mecanismo de acción. El ácido giberélico (GA3) y el ácido indol-acético (IAA) se asocian a la disponibilidad de nutrientes de las plantas (Harman 2011). Por otra parte, se atribuye la promoción del crecimiento a la capacidad de *Bacillus* para incrementar la absorción de nutrientes, mejorar los rendimientos de las plantas, disminuir la producción de etileno, permitir la emergencia de raíces adventicias y mejorar la división y diferenciación celular. Todo esto proporciona protección a la planta ante estrés biótico y abiótico. Igualmente, la capacidad de solubilización de fosfato se considera como uno de los rasgos más importantes asociados a la nutrición de las plantas. Varias especies de *Bacillus* muestran potencial en la solubilización de fósforo (Sicua et al. 2015).

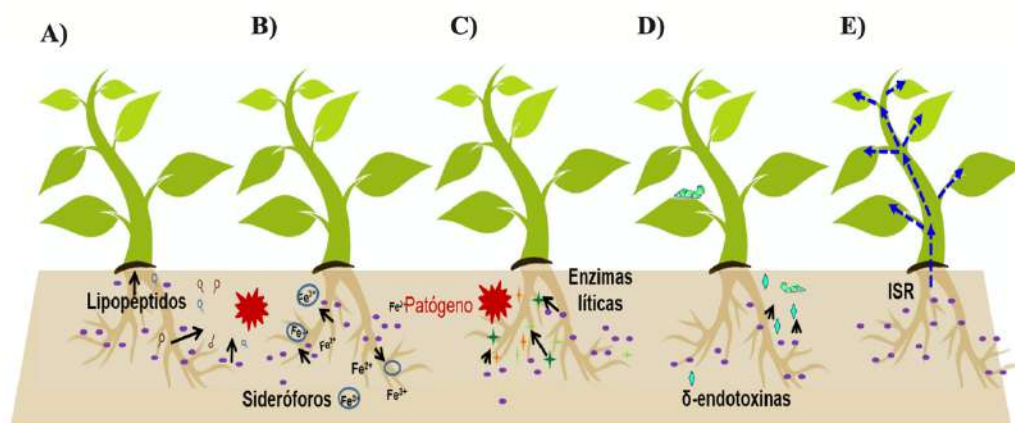


Figura 2. Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*. Producción de A) lipopéptidos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) δ-endotoxinas, E) inducción a la respuesta sistémica. Tomado de Villareal-Delgado et al. (2018)

III. JUSTIFICACIÓN

La mancha bacteriana causada por especies del género *Xanthomonas* es una de las principales enfermedades bacteriana que afecta al cultivo de chile en México. Esta enfermedad puede causar pérdidas económicas mayores al 50% ya que afecta el rendimiento del cultivo debido a la pérdida de follaje o la presencia de manchas en los frutos, lo cual los hace no aptos para la comercialización (Fayette et al. 2012). Esta enfermedad se presenta cada año en el cultivo de chile con incidencias de hasta un 69% con una severidad de 48% (Aguilar-Rincón 2012). Esta enfermedad se puede prevenir con el empleo de semilla certificada, el uso de plántulas libres de patógenos y se controla en campo por medio de aplicaciones de productos a base de cobre como Mancozeb® y Maneb®, así como el uso de antibióticos como gentamicina, estreptomicina y oxitetraciclina (Moura et al. 2020). Sin embargo, este patógeno ha desarrollado resistencia a algunos de estos productos (Hamza et al. 2010, Abbasi et al. 2015, Griffin et al. 2017, Areas et al. 2018, Strayer-Scherer et al. 2018). Por otro lado, los usos de agroquímicos han afectado la salud de aplicadores y consumidores, así como el medio ambiente. Para reducir los riesgos de contaminación ambiental, es importante aplicar otros métodos de control, siendo el control biológico una buena opción. Las bacterias del género *Bacillus* sp. son muy eficientes antagonistas contra diversos microorganismos fitopatógenos, y podrían ser una buena alternativa para el control de *Xanthomonas*, gracias a sus mecanismos de acción, que son amigables con el medio ambiente y no generan resistencia en el patógeno. Por lo anterior, en el presente estudio se plantea evaluar la efectividad de aislamientos seleccionados de *Bacillus* sp. obtenidos de suelo, como agentes de biocontrol y promotores de crecimiento vegetal para la elaboración de un formulado que permita el control de *Xanthomonas euvesicatoria* agente causal de la mancha bacteriana y la promoción del crecimiento del cultivo de chile, en la zona Centro-Sur del Estado de Chihuahua.

IV. HIPÓTESIS

La aplicación de aislamientos seleccionados de bacterias del género *Bacillus* obtenidos de suelo, son efectivos para el control de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* y favorecen la promoción del crecimiento del cultivo de chile.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Formular un producto biológico a base de *Bacillus* spp. para el control de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* y su efecto en la promoción del crecimiento del chile (*Capsicum annuum* L.).

5.2 Objetivos específicos

1. Monitorear la mancha bacteriana en cultivos de chile dentro de la zona Centro-Sur de Chihuahua.
2. Aislar e identificar molecularmente al agente causal de la mancha bacteriana del chile.
3. Determinar la patogenicidad y virulencia de los agentes causales de la mancha bacteriana en el cultivo de chile.
4. Determinar la efectividad de los antimicrobianos gentamicina, oxitetraciclina y cobre, sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de aislamientos de *Xanthomonas* spp.
5. Detectar marcadores moleculares de resistencia al cobre entre los aislamientos de *Xanthomonas* causantes de la mancha bacteriana del chile.
6. Aislar e identificar molecularmente a *Bacillus* spp. nativos y determinar su potencial como agente de biocontrol de *Xanthomonas* spp., agentes causales de la mancha bacteriana en chile.
7. Determinar *in vivo* el potencial antagonista de cepas de *Bacillus* spp. contra las cepas más virulenta de *Xanthomonas* spp. en plantas de chile jalapeño.
8. Evaluar *in vivo* el efecto de *Bacillus* spp., con potencial antagónico contra *Xanthomonas* spp., sobre el crecimiento de plántulas de chile.
9. Evaluar el efecto de un producto formulado a base de *Bacillus* spp., sobre la promoción del crecimiento en chile bajo condiciones de invernadero.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Monitoreo de enfermedades del chile

El estudio se realizó en la zona agrícola de la colonia Lázaro Cárdenas, municipio de Meoqui, Chihuahua, en 52 hectáreas de chile jalapeño ubicadas en las coordenadas 28° 23' 7.54" N 105° 34' 51.86" O (Figura 3). Se monitorearon las variedades de chile jalapeño Grande, Ball Park, Page, Rivera, Imperial y Leopardo, por ocho semanas durante el ciclo agrícola 2017. Para determinar la incidencia y severidad de las enfermedades, en cada lote se seleccionaron cinco cuadrantes de 25 × 20 m² ubicados en los extremos y parte media de cada predio. La incidencia de la enfermedad fue estimada calculando el porcentaje de plantas infectadas en los cuadrantes.

La severidad de la marchitez se midió de acuerdo con la escala propuesta por Velásquez y Medina (2005), la cual contiene tres categorías; 1) planta sana, 2) planta con síntomas de marchitez con o sin amarillamiento y 3) planta seca. Por otra parte, la severidad de la mancha bacteriana se determinó mediante la escala propuesta por López y Gonzáles (2001); la cual consta de cinco categorías; 0) planta sana, 1) plantas con manchas en la parte superior del follaje hasta 25%, 2) plantas con manchas en el follaje desde 25.1% al 50%, 3) planta con manchas en el follaje del 50.1 al 75% con lesiones en tallos y ramas y 4) plantas con lesiones de mas de 75.1% al 100%. Para virosis, se consideraron las plantas con sintomas asociados a esta enfermedad y se utilizó una escala arbitraria con tres caterogrías propuesta por López y Gonzales (2001): 1). Planta con menos del 30% del follaje con amarillamiento; 2) Planta con más del 30% del follaje con amarillamiento más achaparramiento y 3) planta con más del 30% del follaje con amarillamiento, más achaparramiento, más daños en frutos. La cenicilla se evaluó con la escala propuesta por López y Gonzáles (2001); 0) planta sana, 1) planta afectada en el follaje hasta un 25%, 2) planta afectada desde 25.1 al 50%, 3) planta con lesiones de 50.1 al 75% y 4) planta afectada de más del 75% al 100% del follaje.

El cálculo de la severidad se realizó empleando la siguiente fórmula propuesta por (Escalona 2002):

$$IS = (\sum n, v / XN) * 100$$

En donde: IS= Índice de severidad, n= número de plantas de cada categoría, v= valor numérico de cada categoría y N= número total de plantas por lote, X=número de categorías.

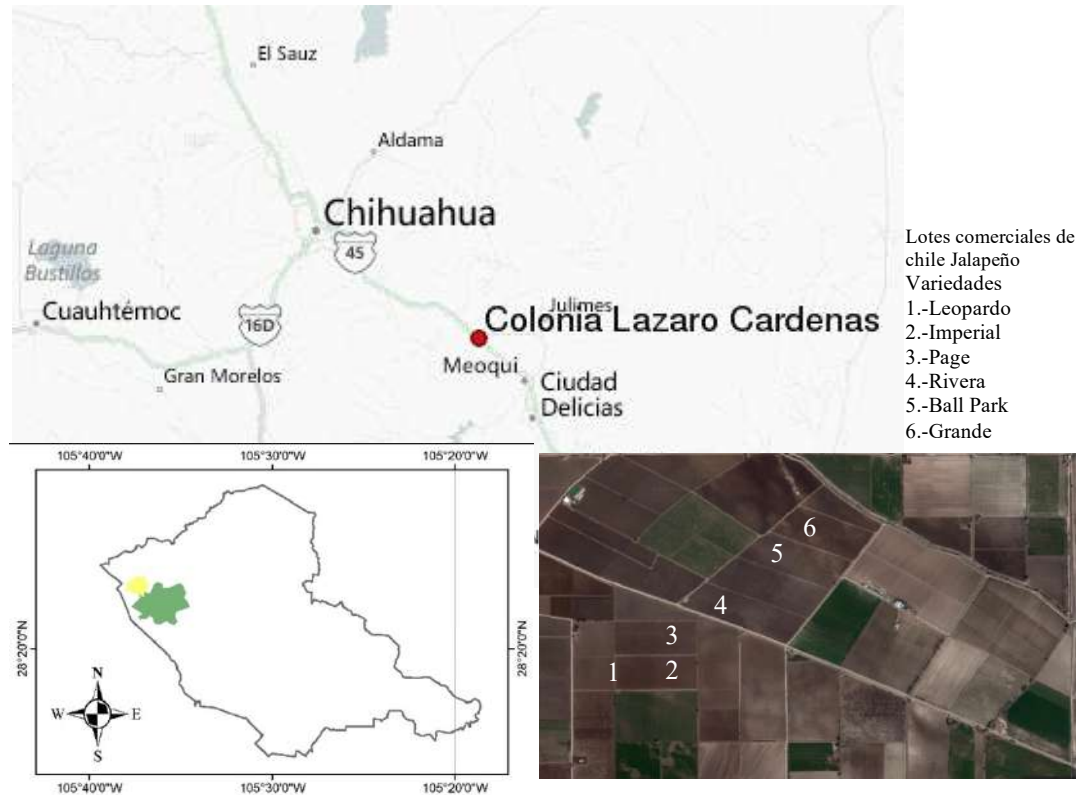


Figura 3. Mapa de lotes comerciales de chile jalapeño en la colonia Lázaro Cárdenas, Municipio de Meoqui, Chihuahua. Google maps (2021), INEGI 2021.

6.2 Aislamiento e identificación del patógeno

Para este estudio se seleccionaron 30 lotes de cultivo de chile de la zona agrícola de Lázaro Cárdenas, municipio de Meoqui, Chihuahua (Figura 4). Una vez ubicados los lotes se colectaron muestras foliares de plantas con la sintomatología característica de la mancha bacteriana. Se tomaron cinco muestras foliares por cada lote con la técnica “cinco de oros”, se etiquetaron, se colocaron en bolsas de plástico y se pusieron en una hielera a 5 °C para su traslado al laboratorio. Las muestras se fotografiaron y se almacenaron a 4 °C para su conservación hasta su procesamiento.

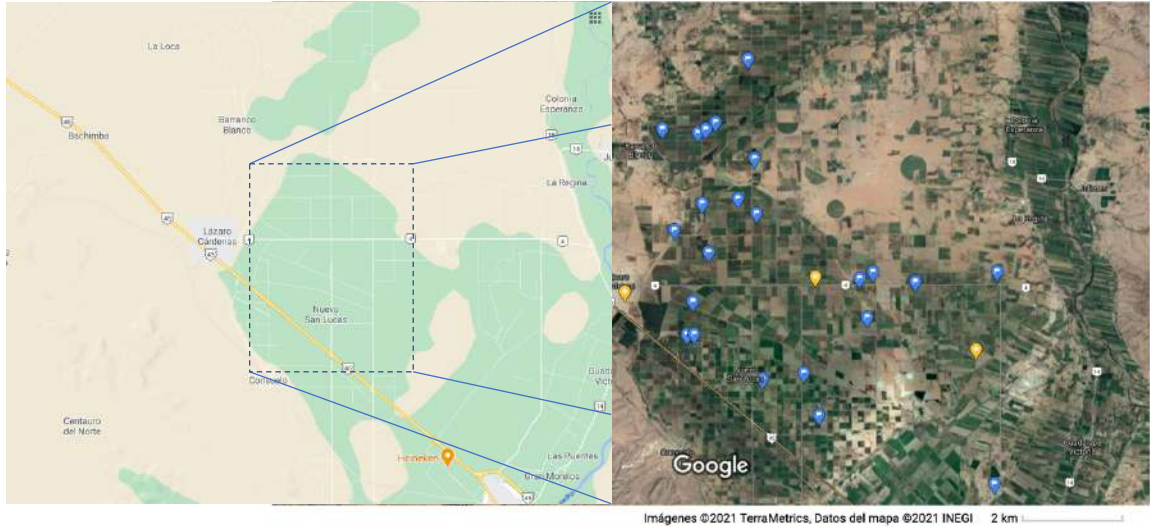


Figura 4. Mapa de lotes de chile jalapeño donde se recolectaron muestras de plantas y suelo, en la región de Lázaro Cárdenas, Municipio de Meoqui, Chihuahua. Google Maps, 2021.

6.2.1 Aislamiento del patógeno

El aislamiento del patógeno se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Schaad et al. (2001). Para ello, las hojas con síntomas de la mancha bacteriana se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante dos minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, se cortaron pequeñas secciones del margen de la mancha en las hojas, de aproximadamente 5 mm^2 y se maceraron individualmente con $500 \mu\text{L}$ de agua destilada estéril, utilizando morteros estériles hasta obtener una mezcla homogénea. Las suspensiones resultantes se esparcieron sobre agar nutritivo (AN; BD Difco Laboratories, Sparks Maryland, MD) y las placas se incubaron a 27°C durante 48 h, después de lo cual se examinaron para detectar el desarrollo de colonias bacterianas. Se obtuvieron cultivos puros de cepas bacterianas mediante subcultivo de colonias en medio AN.

6.2.2 Identificación del patógeno

6.2.2.1 Identificación fenotípica

Los aislamientos bacterianos se sometieron a pruebas bioquímicas y fisiológicas estándar de acuerdo con Shaad et al. (2001). Se realizaron tinciones de Gram (Hycel®, Zapopan, Jalisco, México), la determinación de la actividad de oxidasa y catalasa, y determinación de crecimiento aeróbico / anaeróbico. Además, las cepas se cultivaron en medio semiselectivo SX [10 g de almidón, 1 g de extracto de carne, 5 g de cloruro de amonio, 2 g de K_2HPO_4 , 1 mL de violeta de metilo 2B (solución al 1% en etanol al 20%), 2 mL de verde de metilo (solución acuosa al 1%), 15 g de agar y 5 mL de cicloheximida (5,0 g a 10 mL de metanol y ajustada a 100 mL con agua estéril), en medio King's B (20 g proteosa peptona, 1,5 g de K_2PO_4 , 1,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 mL de glicerol y 15 g de agar) para determinar fluorescencia y se determinó su morfología colonial en medio de agar de dextrosa carbonato calcio de extracto de levadura [YDC; 10 g/L de extracto de levadura (BD Difco Laboratories), 20 g/L dextrosa, 20 g/L de carbonato cálcico (Fagalab, Sinaloa, México) y 15 g/L de agar (BD Difco Laboratories)]. La cepa *X. campestris* ATCC 1395 se utilizó como control positivo en todas las pruebas. Por otra parte, se determinó la actividad amilolítica de *Xanthomonas* en placas de AN que contenían 0.2% de almidón soluble (Jones et al. 2004).

6.2.2.2 Identificación molecular

Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó mediante el método modificado de fenol-cloroformo propuesto por Bardakci y Skibinski (1994). Para ello, se tomaron 1.5 mL de cada aislamiento bacteriano cultivado en CN durante 24 h y se centrifugó dos veces a 12,000 rpm durante 5 min a 4 °C, tras lo cual se descartó el sobrenadante. Enseguida, se agregaron 100 µL de dodecilsulfato de sodio al 10%, 100 µL de NaCl 5 M y bromuro de cetiltrimetilamonio y la mezcla se homogeneizó mediante agitación con vórtex a 3400 rpm (VX-200, Labnet International, Inc. NJ). Posteriormente, se incubó la mezcla 10 min a 65 °C en baño maría. Después, se agregaron 750 µL de mezcla de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló con vórtex a 3.400 rpm y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a 4 °C. Para precipitar el ADN, se tomó el sobrenadante y se agregaron

500 µL de isopropanol. A continuación, la mezcla se agitó a 2,000 rpm y se colocó en el congelador a 20 °C durante 24 h, después de lo cual se centrifugó la solución a 12,000 rpm durante 10 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó dos veces con 300 µL de etanol al 70%, se centrifugó durante 10 min, se secó a 25 °C durante 30 min y se suspendió en 50 µL de tampón Tris-EDTA (TE) (Tris-HCl 10 mM, disodio 1 mM Solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a pH 8. Las muestras se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Protocolo de PCR

La concentración de ADN de las muestras se obtuvo con ayuda de un Eppendorf BioSpectrometer basic (Eppendorf do Brasil Ltda., Ciudad de México), ajustando la concentración final por muestra a 5 ng/µl. Para identificar a agente antagónico se realizó una PCR multiplex, utilizando los pares primers específicos para *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri* y *X. perforans* (Koenraadt et al. 2009) (Tabla 1).

La mezcla de reacción de PCR se realizó utilizando un volumen de 25 µL. Cada mezcla de reacción de PCR consistió de una mezcla de 15.5 µL de agua estéril, 5 µL de tampón de PCR 5X, 1.5 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de dNTP 25 mM (PROMEGA, LMadison, Wisconsin, EUA), 1 µL de cada primer (concentración de stock de 10 µM), 1.5 µL de ADN a 5 ng/µL y 0.2 µL de ADN polimerasa Taq de 5 U/µL (PROMEGA, Madison, WI). Las reacciones de PCR se realizaron con un termociclador, con el programa de amplificación propuesto por Koenraadt et al. (2009), el cual consistió de: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, alineación a 64 °C para 1 min, y extensión a 72 °C durante 1 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando bromuro de etidio 1X como agente intercalante, durante 120 min y observando en un fotodocumentador GenLogic 200 (Kodak, Nueva York, NY).

Tabla 1. Primers usados para identificar el agente causal de la mancha bacteriana en chile ¹

Especie	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño de Amplicon (bp)
<i>X. euvesicatoria</i>	Bs-XeF	CAT GAA GAA CTC GGC GTA TCG	173
	Bs-XeR	GTC GGA CAT AGT GGA CAC ATA C	
<i>X. vesicatoria</i>	Bs-XvF	CCATGTGCCGTTGAAATACTTG	138
	Bs-XvR	ACAAGAGATGTTGCTATGATTTGC	
<i>X. gardneri</i>	Bs-XgF	TCAGTGCTTAGTTCCTCATTGTC	154
	Bs-XgR	TGACCGATAAAGACTGCGAAAG	
<i>X. perforans</i>	Bs-XpF	GTCGTGTTGATGGAGCGTTC	197
	Bs-XpR	GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG	

¹Tomado de Koenraadt et al. (2009).

6.3 Pruebas de patogenicidad y virulencia

La evaluación de la patogenicidad y virulencia de los aislamientos de *Xanthomonas* se realizó en plántulas de chile variedad M (Southern Star Seeds S. de R.L. de C.V., Ciudad de México). Para ello, se cultivaron plántulas en macetas de 10 cm de diámetro, llenas de perlita hortícola expandida estéril, bajo una luz de 16 h a 28 °C y 8 h de oscuridad a 18 °C, las cuales fueron regadas cada tercer día con una solución nutritiva propuesta por Otazú y Chuquillanqui (2007). Las pruebas se realizaron en plántulas de chile de 30 días de edad. Para la inoculación se prepararon suspensiones bacterianas a partir de un cultivo de 24 h de edad crecido en caldo nutritivo (CN; BD Difco Laboratories) a una concentración de 1×10^8 UFC/mL, correspondiente a una densidad óptica (DO) de 0.04 a 600 nm por espectrofotometría UV-visible (Evolution 60 S; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) (Mbega et al. 2012). Enseguida, se infiltraron 10 µL de cada suspensión bacteriana en las hojas usando jeringas Plastipak SFP de 1 mL (Becton-Dickinson, Brooklyn, NY) y agua destilada estéril como control. Se infiltraron tres hojas con dos puntos en cinco plántulas por cada aislamiento bacteriano. Antes y después de la prueba, las plántulas se acondicionaron 2 d en oscuridad, con humedad relativa superior al 90% en una cámara plástica cerrada de 27 galones (Plastic Trends, Jalisco, México). La patogenicidad se determinó por el número de hojas inoculadas con presencia de síntomas de la enfermedad. La severidad de la enfermedad se determinó a los 5 y 10 días después de la inoculación, calculando el porcentaje de daño foliar, utilizando la aplicación Canopeo (<https://canopeoapp.com>).

Canopeo es una aplicación que utiliza un sistema rojo, verde y azul (RGB). Produce análisis de píxeles de acuerdo con las relaciones R / G, B / G y el exceso de índice verde. Los resultados se interpretaron en imágenes binarias donde los píxeles blancos corresponden a la lámina foliar y los píxeles negros representaban una superficie no viva (Patrignani y Ochsner 2015). La severidad se evaluó considerando el porcentaje de verde presente en las hojas. Un valor del 100% se asoció con hojas sanas, mientras que los porcentajes más bajos se consideraron hojas dañadas por *Xanthomonas*.

6.4 Susceptibilidad de *Xanthomonas* a antimicrobianos

La sensibilidad a los antimicrobianos de trece aislamientos se evaluó mediante métodos de dilución en caldo propuesto por Wiegand et al. (2008). Para esta prueba se seleccionan los aislamientos de *Xanthomonas* que presentaron mayor severidad de la enfermedad en la prueba de patogenicidad, así como dos cepas con severidad media y dos con severidad baja. Los productos evaluados fueron Glucob Plus® [gluconato de cobre 8% + ácido cítrico 1% (CuG)], Coboxo® [oxicloruro de cobre 45% + clorhidrato de oxitetraciclina 37.7% (Cu + O)], Final Bacter® [gentamicina 2% + oxitetraciclina 6% (G + O)], sulfato de gentamicina (G) y sulfato de cobre pentahidratado (CuS; Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.).

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se prepararon diluciones de cada uno de los antimicrobianos con caldo de triptona de soja (TSB) a 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 y 640 µg/mL. Por otro lado, se prepararon soluciones bacterianas de cada aislamiento ajustadas al estándar 0.5 de McFarland (Becton, Dickinson y Co., Franklin Lakes, NJ) mediante turbidimetría, equivalente a 1×10^8 UFC / ml en TSB. Las soluciones bacterianas se mezclaron y se diluyeron a 1:100. Posteriormente se colocaron en una microplaca, agregando 50 µL de solución bacteriana más 50 µL de solución antimicrobiana, teniendo como inóculo final una concentración de 5×10^5 UFC/mL. Se utilizaron 100 µL de TSB como control negativo, 50 µL de TSB + 50 µL de cada antimicrobiano como blanco y TSB + suspensión bacteriana como control positivo. Enseguida, se sellaron las microplacas con parafilm y se incubaron a 28 °C durante 48 h

con agitación constante a 225 rpm. Después de la incubación, se leyeron las densidades ópticas (DO) en un lector de microplacas Flash Varioskan (Thermo Fisher Scientific Inc.) a 600 nm para la determinación de las CIM. Para ello se emplearon las siguientes fórmulas propuestas por Wiegand et al. (2008):

$$A_{prueba} = A_{lectura} - A_{CA}$$

Donde:

A_{prueba} = Absorbancia real de la prueba

$A_{lectura}$ = Absorbancia obtenida tras la lectura

A_{CA} = Absorbancia del control antibiótico

$$A_{prueba} = A_{lectura} - A_{CN}$$

Donde:

A_{prueba} = Absorbancia real de la prueba

$A_{lectura}$ = Absorbancia obtenida tras la lectura

A_{CN} = Absorbancia del control negativo

La primera fórmula se empleó para las concentraciones de 640 a 32 µg/mL, debido a que los productos comerciales presentaban una turbidez propia y la segunda fórmula se usó para las concentraciones de 16 a 4 µg/mL, ya que, en este rango de concentración, la absorbancia está más relacionada al control negativo en caso de no presentar crecimiento (Díaz et al. 2000). Los resultados fueron tomados como positivo si la absorbancia era igual o mayor a 0.08, indicando crecimiento de las bacterias y considerado como negativo si ésta era menor a 0.08 (Wiegand et al. 2008). El crecimiento bacteriano se confirmó sembrando 10 µL de cada tratamiento más 990 µL de TSB en AN e incubándolo a 28 °C durante 48 h. Las pruebas se realizaron por triplicado.

La resistencia al cobre se determinó cuando hubo crecimiento de *Xanthomonas* a partir de una concentración de compuestos a base de cobre de 200 µg/mL (Roach et al. 2020), la resistencia a la oxitetraciclina se consideró cuando el crecimiento bacteriano se presentó a partir de 25 µg/mL de oxitetraciclina (Farfán et al. 2014) y resistencia a la gentamicina se determinó cuando el crecimiento bacteriano se presentó a partir de 25 µg/mL de gentamicina (Rojas et al. 2019).

6.5. Detección de genes de resistencia al cobre

La detección de genes *copLAB*, asociados a la resistencia al cobre, se realizó en los aislamientos de *Xanthomonas* empleados en la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos. Los primers utilizados fueron los descritos por Behlau et al. (2013) (Tabla 2). La detección de los genes *copLAB* se realizó por PCR utilizando un volumen de mezcla de reacción de 25 µL. Cada mezcla de reacción de PCR consistió en 25 µL de muestra de ADN de *Xanthomonas* mezclada con 15,5 µL de agua estéril, 5 µL de tampón de PCR 5X, 1.5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,8 µL de dNTP 25 mM (PROMEGA, LMadison, Wisconsin, EUA), 1 µL de cada primer (concentración de stock de 10 µM), 1 µL de ADN de la muestra a 5 ng/µL y 0,2 µL de ADN polimerasa Taq de 5 U/µL (PROMEGA, Madison, WI). Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Behlau et al. (2013). Inicialmente se incubaron a 95 °C durante 5 min y luego se ejecutaron 30 ciclos de PCR en las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C durante 30 s, hibridación de cebadores a 60 °C para todo el conjunto de primers para los tres genes *cop* durante 30 s, y la extensión del ADN a 72 °C durante 45 s en cada ciclo. Después del último ciclo, los tubos de PCR se incubaron durante 10 min a 72 °C y luego a 4 °C. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.0%, utilizando bromuro de etidio 1X como agente intercalante, durante 120 min y se observaron con un fotodocumentador GenLogic 200 (Kodak, Nueva York, NY).

Tabla 2. Primers usados para identificar genes de resistencia al cobre *CopLAB* en *Xanthomonas* spp.¹

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)
<i>CopL</i>	CopLF	CCGTGTCAGCCTCCTCACTTCTAC	356
	CopLR	CAGCGGCATGACATCCAGGCC	
<i>CopA</i>	CopAF	CCTCCATGGCACGGACACTTCCATC	870
	CopAR	CCAGACATATCCATCGACCCATGATCCA	
<i>CopB</i>	CopBF	CTCAGGATCACTCTGCACATCAG	531
	CopBR	GCACGTAGCTCTTAATCGAGTTGTC	

¹ Tomado de Behlau et al. (2013).

6.6 Aislamiento e identificación de *Bacillus* spp.

6.6.1 Colecta de muestras

Para este estudio se seleccionaron 30 lotes de cultivo de chile de la zona agrícola de Lázaro Cárdenas, municipio de Meoqui, Chihuahua (Figura 4). Una vez ubicados los lotes se colectaron cinco muestras de suelo por lote en “cinco de oros”, tomando aproximadamente un kilo de suelo a 20 cm de profundidad. Las muestras se etiquetaron y almacenaron hasta su procesamiento.

6.6.2 Aislamiento

El aislamiento de las bacterias se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Astorga-Quirós et al. (2014). Para ello, se pesó un gramo de suelo de cada muestra y colocó en un tubo de ensayo con tapa con 9 mL de solución salina estéril (0.85%). Después, los tubos se agitaron por 3 minutos con un agitador (Vortex Daigger Genie II). Posteriormente, los tubos fueron colocados en baño María a 80 °C por 10 min. Una vez transcurrido el tiempo, se hicieron diluciones seriadas en microplaca de acuerdo a la metodología propuesta por Lugo et al. (2012). Para ello se tomaron 100 µL de solución de cada tubo y se colocaron en los pocillos de la primer serie de la microplaca (muestra madre), los consiguientes pocillos fueron rellenados con 180 µL de solución salina estéril (0.85%), una vez llenos se toman 20 µL de la muestra madre y se vacían en un pocillo de la segunda serie de la microplaca, agitando con ayuda de una micropipeta, obteniendo así primera dilución. De esa primera dilución se tomarón 20 µL y se vacían en los pocillos de la tercera serie de pocillos, repitiendo la operación anterior, hasta obtener una dilución en factor 1×10^6 . Las diluciones fueron transferidas con ayuda de un replicador a cajas petri con medio agar nutritivo (AN). Las cajas se incubaron por 24 h a 28 °C en una incubadora Thermo Scientific Imperial III. Trascurrido el tiempo, se aislaron las colonias con características típicas del género *Bacillus* en medio AN; para ello se tomó en cuenta su tamaño, forma, elevación y textura, de acuerdo con lo descrito por Calvo y Zúñiga (2010).

6.6.3 Identificación de *Bacillus* spp.

6.6.3.1 Identificación fenotípica

Los aislamientos bacterianos se sometieron a pruebas bioquímicas y fisiológicas estándar de acuerdo con lo propuesto por Schaad et al. (2001). Para lograrlo, se realizaron tinciones de Gram, pruebas de KOH y tinciones de Schaeffer-fulton (Mormak y Casida, 1985). Esta última prueba, para corroborar la presencia de endosporas. Además, se realizó la prueba de motilidad por gota pendiente (Vázquez et al. 2011), la cual consistió en colocar en un portaobjetos una gota del crecimiento bacteriano en caldo nutritivo (CN) de 24 h de incubación y colocar el portaobjetos sobre una base de plástico con un hueco, quedando la gota en la parte inferior de manera suspendida. Enseguida, las muestras se colocaron en un microscopio óptico (Leica DM1000), observando la movilidad de las células bacterianas. La prueba se consideró positiva si los aislados presentaban motilidad.

6.6.3.2 Identificación molecular

Extracción de DNA

La extracción de ADN se realizó mediante el método modificado de fenol-cloroformo propuesto por Bardakci y Skibinski (1994) (ver sección 6.2.3).

Protocolo de PCR

La concentración de ADN de las muestras se obtuvo con ayuda de un Eppendorf BioSpectrometer basic (Eppendorf do Brasil Ltda., Ciudad de México), ajustando la concentración final por muestra a 5 ng/μL. Para identificar al agente antagónico se realizó una PCR, utilizando los pares de cebadores específicos para *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *B. subtilis* y *B. thuringiensis* (Tabla 3) (Park et al. 2007, Sadeghi et al. 2012).

La mezcla de reacción de PCR se realizó utilizando un volumen de 25 μL. Cada mezcla de reacción de PCR consistió de una mezcla de 15.5 μL de agua estéril, 5 μL de tampón de PCR 5X, 1.5 μL de MgCl₂ 25 mM, 1 μL de dNTP 25 mM (PROMEGA, LMadison, Wisconsin, EUA), 1 μL de cada primer (concentración de stock de 10 μM), 1.5 μL de ADN a 5 ng/μL y 0.2 μL de ADN polimerasa Taq de 5 U / μL (PROMEGA,

Madison, WI). Las reacciones de PCR se realizaron con un termociclador, con el programa de amplificación propuesto por Park et al. (2007) y Sadeghi et al. (2012), el cual consistió de: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, de alineamiento a 63 °C por 30 s y de extensión a 72 °C por 30 s y finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, luego 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 5 min, alineación a 64 °C para 1 min, y extensión a 72 °C durante 1 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min. Los resultados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando bromuro de etidio 1X como agente intercalante, durante 120 min y observando en un fotodocumentador GenLogic 200 (Kodak, Nueva York, NY).

Tabla 3. Primers usados para la identificación de especies de *Bacillus*¹

Especie	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicon (pb)
<i>B. cereus</i>	BCGSH-1F	GTG CGA ACC CAA TGG GTC TTC	400
	B CGSH-1R	CC T TGT TGT AC C AC T TG C TC	
<i>B. anthracis</i>	BASH-2F	GGT AGA TTA GCA GAT TGC TCT TCA AAA GA	253
	BASH-2R	ACG AGC TTT CTC AAT ATC AAA ATC TCC GC	
<i>B. thuringiensis</i>	BTJH-1F	GCT TAC CAG GGA AAT TGG CAG	299
	BTJH-R	ATC AAC GTC GGC GTC GG	
<i>B. cereus</i>	BCJH-F	TCA TGA AGA GCC TGT GTA CG	475
	BCJH-1R	CGA CGT GTC AAT TCA CGC GC	
<i>B. mycoides</i>	BMSH-F	TTT TAA GAC TGC TCT AAC ACG TGT AAT	604
	BMSH-R	TTC AAT AGC AAA ATC CCC ACC AAT	
<i>B. licheniformis</i>	AY185898-F	CTGGGGGACATGCTGATCCGCA	497
	AY185898-R	AAGTCCGGATGGGCGGCACACA	
<i>B. subtilis</i>	AJ539133-F	TTTACGATGGCGTTCAGCAAC	744
	AJ539134-R	GGAAGTGCCTTCATTTCCGGCT	

Tomado de Park et al. (2007) y Sadeghi et al. (2012).

6.7 Confrontación directa *in vitro* de *Bacillus* vs. *Xanthomonas* spp.

Para este ensayo se seleccionaron como antagonistas a 22 cepas bacterianas caracterizadas fenotípicamente como *Bacillus* y *B. subtilis* del producto comercial Serenade®, y los patógenos fueron las seis cepas de *Xanthomonas* más virulentas y *X. campestris* ATTC1395 como control. Para la confrontación *in vitro* se prepararon suspensiones bacterianas a partir de cultivos de 24 h de crecimiento a 28 °C a 120 rpm en medio líquido Luria Bertani (LB) a pH 7.0. La concentración de las bacterias se ajustó a 1×10^8 UFC/mL, correspondiente a una DO de 0.04 a 600 nm por espectrofotometría UV-visible (Evolution 60 S; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) para *Xanthomonas* y a una DO de 0.04 a 600 nm para *Bacillus* (Mbega et al. 2012). Posteriormente, se colocaron en una microplaca, agregando 75 µL de solución bacteriana de las *Xanthomonas* más 75 µL de solución bacteriana de *Bacillus*. Se utilizaron 150 µL de LB como control negativo y 75 µL de LB más 75 µL de cada bacteria fitopatógena como control positivo. Enseguida, se sellaron las microplacas con parafilm y se incubaron a 28 °C durante 72 h. El crecimiento bacteriano de *Xanthomonas* se confirmó cada 24 h, al realizar resiembras por la técnica de estriado en placa en AN, incubándolas a 28 °C por 48 h. El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar, empleando tres repeticiones por tratamiento (aislamientos de *Bacillus* spp.).

La inhibición de *Xanthomonas* por los *Bacillus* se determinó de forma cualitativa considerando positiva la inhibición del patógeno, cuando en las resiembras no se creció ninguna colonia del patógeno y como negativa la inhibición, cuando hubo crecimiento colonial del patógeno en las resiembras.

6.8 Biocontrol de la mancha bacteriana en condiciones controladas

El biocontrol de la mancha bacteriana por *Bacillus* spp. se determinó mediante la inoculación de plantas de chile en la raíz (inducción de resistencia) y por la aspersión de los antagonistas al follaje (biocontrol foliar directo), previo a la aplicación de los fitopatógenos. Para ello, se seleccionaron como agentes de biocontrol siete aislamientos de *Bacillus* y dos productos comerciales (Serenade® y FitoFort®) y como patógenos se seleccionaron dos, *X. euvesicatoria* Xe65 y *X. perforans* Xp47. Los ensayos se realizaron

bajo condiciones controladas manteniendo un fotoperiodo de 16 h luz a 28 °C y 8 h de oscuridad a 18 °C, durante el tiempo de evaluación.

6.8.1 Inducción de resistencia a *Xanthomonas*

Para el desarrollo de este ensayo se cultivaron plántulas en macetas de 10 cm de diámetro, llenas de peat moss estéril, bajo un fotoperiodo de 16 h luz a 28 °C y 8 h de oscuridad a 18 °C, las cuales fueron regadas cada tercer día con una solución nutritiva propuesta por Otazu y Chuquillanqui, (2007). La prueba se realizó en plántulas de chile de 35 días de edad, aplicando a la base del tallo de cada plántula 10 ml de suspensiones bacterianas de *Bacillus* y de los productos comerciales a la concentración recomendada comercialmente.

Las suspensiones bacterianas de *Bacillus*, se obtuvieron mediante la siembra de las bacterias antagonicas en medio AN, que se incubaron por 24 h a 28 °C y posteriormente se pasaron a tubos con 5 mL de medio líquido LB a pH 7, incubándolos a 28 °C por 24 h a 120 rpm, en una incubadora agitadora orbital (Thermo Scientific MAXQ 4450). Después, los crecimientos fueron transferidos a matraces Erlen-Meyer con 100 mL de medio líquido LB y se incubaron a 28 °C por 24 h a 120 rpm. Una vez transcurido el tiempo, se prepararon suspensiones bacterianas de *Bacillus* ajustándolas a 1×10^8 UFC/mL con ayuda de un espectrofotómetro de luz visible (Thermo Cientific Evolution 605). Por otro lado, se prepararon suspensiones bacterianas de *Xanthomonas* a partir de un cultivo de 24 h de edad crecido en CN a una concentración de 1×10^8 UFC/mL, correspondiente a una DO de 0.4 a 600 nm (Rabbee et al. 2019)

La inoculación del patógeno se realizó siete días después de la aplicación de los antagonistas, de acuerdo a la metodología descrita en la sección de pruebas de patogenicidad y virulencia (ver sección 6.3). Se inocularon dos hojas con dos puntos en cuatro plántulas por cada tratamiento. Antes y después de la prueba, las plantas se acondicionaron 2 d en oscuridad, con humedad relativa superior al 90% en una cámara plástica cerrada. Los aislamientos de *Bacillus* se consideraron como los tratamientos contra las dos *Xanthomonas*, los productos comerciales Serenade® y FitoFort® como controles positivos, las *Xanthomonas* Xp47 y Xe65 como controles negativos y plantas infiltradas con solución salina al 0.85%, como control control absoluto. El ensayo se

estableció bajo un diseño completamente al azar, teniendo cuatro repeticiones por tratamiento. Para determinar el antagonismo de *Bacillus* se determinó el porcentaje de reducción del daño foliar causado Xp47 y Xe65, al día 15 después de su inoculación. Para ello, se calculó el porcentaje de daño foliar, utilizando la aplicación Canopeo (<https://canopeoapp.com>) y se determinó el porcentaje de inhibición del daño, por medio de la siguiente fórmula.

$$\text{Inhibición de la enfermedad (\%)} = \frac{\text{DFC} - \text{DFT}}{\text{DFC}} \times 100$$

Donde:

DFC= Porcentaje de daño foliar en el control

DFT= Porcentaje de daño foliar en tratamiento

Además, se corroboró la presencia de las cepas bacterianas en tejido foliar y radicular. El reaislamiento de *Xanthomonas* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Shaad et al. (2001) (Ver sección 6.2.1). Para el reaislamiento de *Bacillus* se siguió la metodología descrita por Astorga-Quirós et al. (2014) (ver sección 6.6.2).

6.8.2 Biocontrol foliar directo de *Xanthomonas*

Para el desarrollo de este ensayo se cultivaron plántulas de chile en macetas como se describió en el ensayo anterior (ver sección 6.8.1). La prueba se realizó en plántulas de chile de 35 días de edad, aplicando al follaje de cada planta 3 ml de suspensiones bacterianas de los *Bacillus* y del producto comercial Serenade ® en la dosis recomendada. Por otra parte, se inculó la raíz de plántulas con 10 mL del producto comercial FitoFort ® a la dosis recomendada. Después de tres días, se asperjaron al follaje suspensiones bacterianas de los fitopatógenos.

Para la aplicación de los antagonistas, se prepararon suspensiones de *Bacillus*, las cuales se cultivaron en CN durante 72 h a 28 °C, transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min a 4 °C. En seguida, se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante fue resuspendido con solución salina estéril al 0.85%, la cual contenía 0.005% de tween 20 con la finalidad de aumentar la adherencia al follaje (Chien y Huang 2020). Las soluciones fueron ajustadas a 1×10^8 UFC/mL, correspondiente a DO 0.6 a 600 nm

(Chandrasekaran et al. 2017). Por otro lado, se prepararon suspensiones bacterianas de *Xanthomonas* a partir de un cultivo de 24 h de edad crecido en CN a una concentración de 1×10^8 UFC/mL, correspondiente a una DO de 0.4 a 600 nm (Rabbee et al. 2019)

La inoculación del patógeno se realizó 48 horas después de la aplicación de los antagonistas, para ello se asperjaron 3 ml de las suspensiones bacterianas de *Xanthomonas* sobre el follaje de la plantas de chile. Antes y después de la prueba, las plantas se acondicionaron 2 d en oscuridad, con humedad relativa superior al 90% en una cámara plástica cerrada. Los aislamientos de *Bacillus* se consideraron como los tratamientos contra las dos *Xanthomonas*, los productos comerciales Serenade® y FitoFort® como controles positivos, los aislamientos Xp47 y Xe65 *Xanthomonas* como controles negativos y plantas asperjadas solo con solución salina al 0.85%, como control control absoluto. El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar, teniendo cuatro repeticiones por tratamiento. Para determinar el antagonismo de *Bacillus* se determinó la presencia de manchas en el follaje al día 15 después de la inoculación del patógeno. La inhibición de *Xanthomonas* por los *Bacillus* se determinó de forma cualitativa considerando positiva la inhibición del patógeno, cuando en las hojas no se presentaron síntomas de la enfermedad y como negativa la inhibición, cuando hubo la presencia de síntomas en el follaje.

Además, se corroboró la presencia de las cepas bacterianas en tejido foliar, mediante el reaislamiento de *Xanthomonas* de acuerdo a la metodología descrita por Shaad et al. (2001) (Ver sección 6.2.1) y para el reaislamiento de *Bacillus* se siguió la metodología descrita por Astorga-Quirós et al. (2014) (ver sección 6.6.2), pero tomando el follaje como muestra.

6.9 Biocontrol de la mancha bacteriana en condiciones de invernadero

El bicontrol de la mancha bacteriana por *Bacillus* spp. se determinó mediante la inoculación de plantas de chile en la raíz para inducir resistencia en la planta, previo a la aplicación de los fitopatógenos. Para ello, se seleccionaron como agentes de bicontrol siete aislamientos de *Bacillus* y los productos comerciales Serenade® y FitoFort® y los fitopatógenos *X. euvesicatoria* Xe65 y *X. perforans* Xp47. El ensayo se realizó bajo

condiciones de invernadero a una temperatura media de 27 °C y una humedad aproximada de 80%, durante el tiempo de evaluación.

Para el ensayo de se cultivaron plantas de chile en macetas de 20 cm de diámetro, llenas de una mezcla de peat moss y perlita hortícola en una proporción de 3:1 (v/v), bajo condiciones de invernadero, las cuales fueron regadas cada cinco días con una solución nutritiva para hortalizas de la empresa Comercializadora Hydroenvironment S.A de C.V. La prueba se realizó en plantas de chile de 35 días de edad, aplicando a la base del tallo de cada planta 50 ml de las suspensiones bacterianas de *Bacillus* y de los productos comerciales, después de 5 días se inoculaban hojas de chiles con las *Xanthomonas* por infiltración de la manera descrita en la prueba de patogenicidad (ver sección 6.3). La preparación de las suspensiones bacterianas de *Bacillus* y *Xanthomonas* se realizó de la forma descrita previamente en la prueba de biocontrol de la mancha en condiciones controladas (ver sección 6.8.1). Antes y después de la prueba, las plantas se acondicionaron 2 d en oscuridad, con humedad relativa superior al 90% cubriendo las plantas con plástico.

Los aislamientos de *Bacillus* se consideraron como los tratamientos contra las dos *Xanthomonas*, los productos comerciales Serenade® y FitoFort® como controles positivos, los aislamientos Xp47 y Xe65 de *Xanthomonas* como controles negativos y plantas infiltradas con solución salina al 0.85%, como control control absoluto. El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar, teniendo cuatro repeticiones por tratamiento. Para determinar el antagonismo de *Bacillus* se determinó el porcentaje de reducción del daño foliar causado Xp47 y Xe65, al día 30 después de su inoculación. Para ello, se calculó el porcentaje de daño foliar, utilizando la aplicación Canopeo y se determinó el porcentaje de inhibición del daño, de acuerdo a lo descrito en la prueba de biocontrol de la mancha en condiciones controladas (ver sección 6.8.1).

Al final del ensayo se corroboró la presencia de las cepas bacterianas en tejido foliar y radicular. El reaislamiento de *Xanthomonas* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Shaad et al. (2001) (Ver sección 6.2.1). Para el reaislamiento de *Bacillus* se siguió la metodología descrita por Astorga-Quirós et al. (2014) (ver sección 6.6.2).

6.10 Promoción del crecimiento en plántulas de chile

La promoción del crecimiento de chile por los aislamientos de *Bacillus* se determinó mediante la inoculación en almácigo de plántulas de chile bajo condiciones de invernadero. Para ello, se seleccionaron las 22 cepas bacterianas caracterizadas fenotípicamente como *Bacillus* y *B. subtilis* del producto comercial Serenade®. Las condiciones de crecimiento de las plántulas fueron de 27 °C promedio y una humedad promedio de 80%, durante el tiempo de evaluación.

Para el ensayo de se cultivaron plantulas de chile en charolas de poliestireno de 20 cavidades, llenas con perlita hortícola estéril, las cuales fueron regadas cada tercer día con una solución nutritiva propuesta por Otazu y Chuquillanqui, (2007). La prueba se realizó en plántulas de 18 días de crecimiento, aplicando a la base del tallo de cada plántula 2 ml de las suspensiones bacterianas de *Bacillus* y del producto comercial Serenade® a la dosis recomendada. La preparación de las suspensiones bacterianas de *Bacillus* se realizó de la forma descrita previamente en la prueba de biocontrol de la mancha en condiciones controladas (ver sección 6.8.1). Los aislamientos de *Bacillus* se consideraron como los tratamientos, el producto comercial Serenade® como control positivo y plantas regadas solo con solución nutritiva como control absoluto. El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar, teniendo tres repeticiones por tratamiento.

Para determinar el efecto de *Bacillus* sobre el crecimiento de plántulas de chile, se determinaron los parámetros vegetativos de altura de la planta, diámetro de tallo, longitud de raíz, número de hoja, área foliar y biomasa seca de hoja, tallo y raíz. Estos parámetros fueron determinados al final del estudio al día 40 después de la inoculación de *Bacillus*. En el caso de la biomasa, las plántulas fueron separadas en sus órganos vegetales (hoja, raíz y tallo) y se colocaron en una estufa de secado Shel Lab, durante 72 h a 60 °C hasta su deshidratación total. Para determinar el área foliar, se utilizó la aplicación Canopeo. Al final del ensayo, se demostró la presencia de las bacterianas en la raíz, mediante la metodología descrita por Astorga-Quirós et al., (2014) (ver sección 6.6.2).

6.11 Promoción del crecimiento en plantas de chile con formulados

La promoción del crecimiento de chile por *Bacillus* se determinó mediante la inoculación en almácigo de plántulas de chile e inoculación de plántas jóvenes con formulados de las bacterias bajo condiciones de invernadero. Para ello, se prepararon formulados biológicos con las cepas de *B. cereus* Bc26 y Bc8, *B. thuringiensis* Bt24 y se empleó el producto comercial BactoRaicine®.

6.11.1 Preparación del formulado

Los formulados se prepararon a partir de crecimiento activo de los *Bacillus* en 100 mL de caldo triptona soya (TSB), incubando por 72 h a temperatura ambiente a 120 rpm de agitación. Después del tiempo de incubación, el crecimiento se calentó en baño maría a 90 °C por 10 min. Posteriormente, se centrifugó a 9,000 rpm y se re suspendió en 10 mL de PBS. Los 10 mL se utilizaron para inocular 1 L de TSB, incubando bajo las mismas condiciones durante 24 h. El crecimiento se utilizó para inocular 4 L de TSB en un matraz de 7 L, incubándose por 72 h a temperatura ambiente y una agitación de 120 rpm. Terminando el tiempo de incubación, se procedió a su microencapsulación, para ello se empleó la técnica de secado por aspersión, usando harina de maíz en combinación con cloruro de calcio como matriz del encapsulado, en un Spray Drying Plant Movable Monitor 2000 NIRO modelo A (NIRO Gea, Alemania). Para esto, se disolvió 1 kg de harina de maíz en 5 L de agua purificada y se mantuvo en agitación, después se agregaron 100 mL de aceite de algodón, 200 mL de Inex A, y los 5 L de cultivo, posterior a esto se adicionaron 40 g de CaCl₂ y 300 mL de alcohol isopropílico. El volumen final se procesó en el secador por aspersión, con una presión en la turbina de 1.5 bar, con un flujo de entrada de 55 mL/min a 200 °C, y una temperatura de salida de 80±3 °C. El producto se guardó en bolsas plásticas a 4 °C y se determinaron las UFC.

6.11.2 Promoción de crecimiento en plántulas

Para el ensayo de se cultivaron plántulas de chile en charolas de poliestireno de 20 cavidades, llenas con peatmoss estéril, las cuales fueron regadas cada tercer día con una solución nutritiva para hortalizas de la empresa Comercializadora Hydroenviroment S.A de C.V. La prueba se realizó en plántulas de 10 días de crecimiento, las cuales fueron

inoculadas por inmersión del almácigo en soluciones de los formulados. Para ello, se prepararon soluciones de los formulados a una concentración de 8×10^8 UFC/mL, soluciones del producto BactoRaicine® a una concentración comercial de 8×10^8 UFC/mL y en el control se empleo solución nutritiva. Los formulados se consideraron como los tratamientos, el producto comercial como control positivo y plantas regadas solo con solución nutritiva como control absoluto. Las plántulas fueron tratadas cinco veces cada siete días. El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar, teniendo cuatro repeticiones por tratamiento.

Para determinar el efecto de los formulados sobre el crecimiento de plántulas de chile, se determinaron los parámetros vegetativos de altura de la planta, diámetro de tallo, longitud de raíz, área foliar y biomasa seca y fresca de hoja, tallo y raíz. Además, se determinó el contenidos de pigmentos fotosintéticos de carotenoides y clorofila a y b. Estos parámetros fueron determinados al final del estudio al día 40 después de la germinación. En el caso de la biomasa, las plántulas fueron separadas en sus órganos vegetales (hoja, raíz y tallo) y se colocaron en una estufa de secado Shel Lab, durante 72 horas a 60 °C hasta su deshidratación total. Para determinar el área foliar, se utilizó la aplicación Canopeo y para el contenido de pigmentos, se realizó por la metodología propuesta por Lichtenthaler y Wellburn (1983). Al final del ensayo, se corroboró la presencia de las bacterianas en la raíz, mediante la metodología descrita por Astorga-Quirós et al. (2014) (ver sección 6.6.2).

6.11.3 Promoción de crecimiento en plantas jóvenes

Para el ensayo de se cultivaron plantas de chile en macetas de 20 cm de diámetro, llenas de una mezcla del *peat moss* y perlita hortícola en una proporción de 3:1 (vol/vol), bajo condiciones de invernadero, las cuales fueron regadas cada cinco días con una solución nutritiva para hortalizas de la empresa Comercializadora Hydroenviroment S.A de C.V. La prueba se realizó en plantas de chile de 35 días de edad, aplicando a la base del tallo de cada planta 50 mL de soluciones de los formulados a una concentración 1×10^8 UFC/mL y del producto comercial BactoRaicine® a concentración comercial de 1×10^8 UFC/mL. Las soluciones se consideraron como los tratamientos, los cuales se prepararon empleando los formulados solos, en combinación y la mezcla de los tres, el producto

comercial se consideró como control positivo y plantas regadas solo con solución nutritiva como control absoluto. Las plántulas fueron tratadas cinco veces cada diez días. El ensayo se estableció bajo un diseño completamente al azar, teniendo cinco repeticiones por tratamiento.

Para determinar el efecto de los formulados sobre el crecimiento de plantas de chile, se determinaron los parámetros vegetativos de altura de la planta, diámetro de tallo, longitud de raíz, área foliar, número de hojas y biomasa seca y fresca de hoja, tallo y raíz. Además, se determinó el contenido de pigmentos fotosintéticos de carotenoides y clorofila a y b. Estos parámetros fueron determinados al final del estudio al día 85 después de la germinación. Al final del ensayo, se corroboró la presencia de las bacterianas en la raíz, mediante la metodología descrita por Astorga-Quirós et al. (2014) (ver sección 6.6.2).

6.12 Análisis estadísticos

Los datos de incidencia y severidad de los monitoreos de la mancha bacteriana fueron analizados mediante una regresión logística binaria y mediante prueba de Kruskal Wallis, respectivamente, para determinar el comportamiento de las enfermedades sobre las variedades y durante el tiempo para ello se utilizó el software Minitab Statistical Software v.16.

Los resultados de las pruebas de patogenicidad y virulencia de los aislamientos de *Xanthomonas* y los resultados de la promoción del crecimiento de plántulas de chile por aislamientos de *Bacillus* spp. bajo condiciones controladas, fueron analizados mediante análisis de conglomerados, utilizando el método de distancia euclidiana y se realizó con el software InfoStat (InfoStat versión 2009, Grupo InfoStat, Córdoba, Argentina).

Los datos de inhibición de la mancha bacteriana en plantas de chile bajo condiciones controladas y de invernadero y los datos de la promoción de crecimiento de plántulas y plantas en invernadero por la aplicación de formulados, fueron analizados mediante ANOVAs y pruebas de separación de medias de Tukey. Además, los datos de promoción de crecimiento se analizaron por medio de una análisis multivariado de componentes principales, empleando el software InfoStat.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Monitoreo de enfermedades en el cultivo de chile

Los resultados del monitoreo de las principales enfermedades del cultivo de chile jalapeño en la zona productora de Lázaro Cárdenas municipio de Meoqui, Chihuahua, durante el ciclo agrícola 2017, mostraron un comportamiento variable en cada variedad de chile (Figura 5).

7.1.1 Marchitez del chile

La afectación de las plantas de chile por la marchitez fue variable durante todo el periodo de monitoreo. La variedad Grande tuvo una infección final de 60.25%, seguido de la variedad Page con un 31.67% y finalmente las variedades Imperial (13.04%), Rivera (12.91%), Leopardo (9.48%) y Ball Park (9.19%) presentaron una incidencia similar. La variedad Page tuvo una incidencia mayor desde el inicio del monitoreo en comparación con las otras variedades. El resto de las variedades mostraron porcentajes de incidencia bajos, hasta el 4to monitoreo, a partir del cual la variedad Grande fue afectada rápidamente (Figura 5).

Los resultados de la regresión logística binaria muestran diferencias ($p < 0.05$) en la velocidad de la infección de la marchitez entre las variedades (Tabla 4). La variedad Grande presentó una incidencia 2.77 veces mayor a medida que avanzaba el tiempo. Seguido de la variedad Rivera que presentó 2.06 veces más plantas afectadas en cada monitoreo. Las variedades Leopardo, Imperial y Ball Park no presentaron diferencias estadísticamente, con ORs de 1.80, 1.74 y 1.69 respectivamente. La variedad Page tuvo la menor cantidad de plantas infectadas a medida que transcurrió el tiempo con OR de 1.44. Sin embargo, Page tuvo desde el inicio del monitoreo gran cantidad de plantas infectadas.

7.2.2 Mancha bacteriana

La incidencia de la mancha bacteriana fue diferente entre las seis variedades de chile jalapeño durante el monitoreo (Figura 5). La variedad Leopardo fue la más afectada al final del monitoreo con un 38.36% de plantas enfermas, seguido de la variedad Rivera con un 24.46% y Grande con 12.05% de incidencia. Las variedades Ball Park, Page e

Imperial tuvieron una infección final similar con 4.85%,3.39% y 2.45% de plantas afectadas (Tabla 4). La velocidad de afección en las plantas, de acuerdo a la regresión logística binaria fue diferente entre las variedades de chile jalapeño. La variedad Leopardo fue afectada por la mancha bacteriana con mayor rapidez 1.76 veces más plantas enfermas en cada monitoreo, seguido de las variedad Rivera y Grande con ORs de 1.63 y 1.51, respectivamente. Las variedades Ball Park, Page e Imperial presentaron la menor cantidad de plantas enfermas a medida que transcurrió el tiempo, con ORs de 1.33, 1.27 y 1.23, respectivamente.

7.2.3 Virosis

La incidencia de la virosis en las variedades fue diferente durante el monitoreo. Las variedades Imperial y Page fueron las más afectadas con un 30.92% y 30.17%, respectivamente. Las variedades Ball Park y Rivera fueron las segundas más afectadas con una infección final de 22.9% y 20.67%, respectivamente. Por otra parte, las variedades menos afectadas fueron Leopardo y Grande con 18.86% y 18.69%, respectivamente (Figura 5). Con respecto a la velocidad de afectación por la virosis, la variedad Leopardo registró una incidencia 1.76 veces mayor en cada monitoreo, seguido de la variedad Grande con un OR de 1.68 y la variedad Imperial con OR de 1.43. Finalmente las variedades Rivera, Page y Ball Park, registraron una menor velocidad de infección con ORs de 1.39, 1.29 y 1.27, respectivamente (Tabla 4). A pesar de que no se realizaron pruebas para el diagnóstico de los agentes causales específicos de la virosis, reportes anteriores de López y González (2001) y González-Franco et al. (2014), reportan la misma sintomatología de la virosis presente en las plantas monitoreadas en este estudio. La sintomatología se caracterizó por la presencia de mosaicos amarillos en hojas jóvenes, generalmente ubicadas en la parte superior de las plantas, enchinamiento de hojas, entrenudos cortos, epinastias, frutos amarillos, sugiriendo la presencia de una mezcla de virus, lo cual ya ha sido reportado previamente por González-Franco et al. (2014), pudiéndose encontrar la presencia conjunta de CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY y/o PepMV.

7.2.4 Cenicilla

Las variedades de chile jalapeño fueron afectadas por la cenicilla de forma variable durante el periodo de monitoreo. La mayor cantidad de plantas infectadas se presentó en la variedad Rivera con una incidencia final de 79.85%, seguido de la variedad Ball Park con un 55.02%, la variedad Grande con un 44.24% y la variedad Leopardo con un 44.24%. Las variedades Page e Imperial registraron la menor incidencia al final del monitoreo, con 9.84% y 8.05% de plantas enfermas. La velocidad de incidencia de la cenicilla en las seis variedades de chile mostró diferencias ($p < 0.05$). Las variedades variedades Rivera, Grande y Leopardo fueron iguales en cuanto a la velocidad de afección por la enfermedad con ORs de 3.5, 2.44 y 2.43, respectivamente. La variedad Ball Park presentó 2.29 veces más plantas afectadas en cada monitoreo. Finalmente, las variedades Page e Imperial tuvieron una velocidad de afección igual con ORs de 1.68 y 1.62, respectivamente.

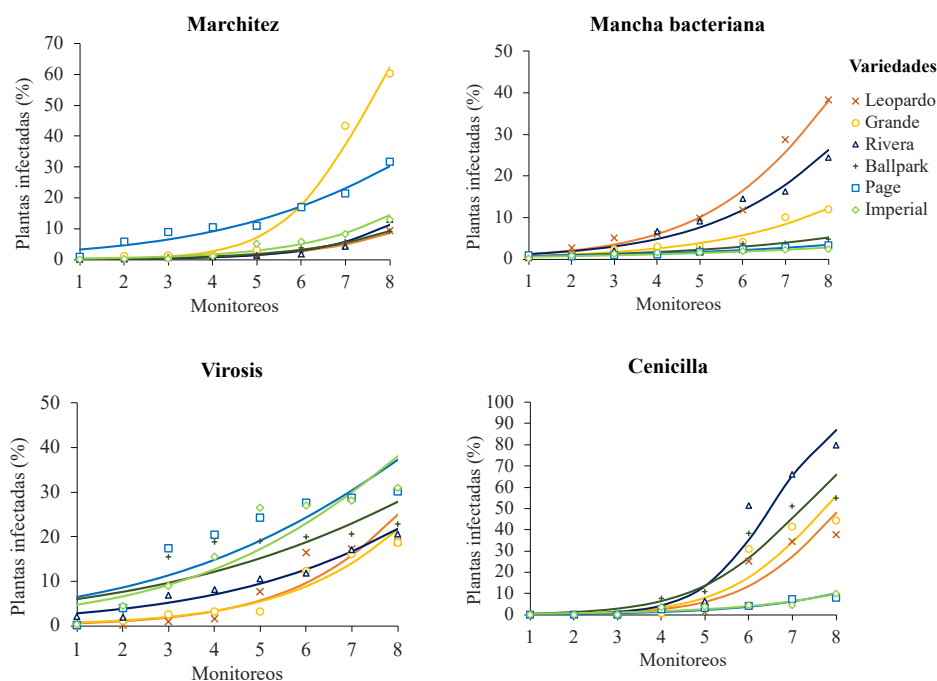


Figura 5. Dinámica del comportamiento de enfermedades en seis variedades de chile jalapeño durante el ciclo agrícola 2017, Mecoqui, Chihuahua.

Al analizar la incidencia general de las enfermedades en todos los cultivares, las variedades Rivera, Grande y Ball Park fueron las más afectadas. La variedad Leopardo, fue afectada mayormente por mancha bacteriana y cenicilla, con 37.58% y 38.36% de

plantas enfermas, respectivamente. La variedad Grande, fue afectada en mayor medida por la marchitez y cenicilla, con 60.25% y 55.02% de infección, respectivamente. La variedad Imperial, registró una mayor incidencia de virosis con un 30.92% de plantas enfermas. La variedad Rivera fue afectada mayormente por la cenicilla con un 79.86% de infección. La variedad Ball Park fue afectada principalmente por la cenicilla con un 55.02% de infección. Finalmente, la variedad Page fue afectada principalmente por la marchitez y virosis con 31.67% y 30.92% de infección.

Tabla 4. Análisis de regresión logística binaria del comportamiento de la incidencia de enfermedades en seis variedades de chile jalapeño durante ocho monitoreos.

Enfermedad	Variedad	Incidencia final (%)	Odds Ratio	IC 95%		Nivel de significancia
Marchitez	Ball park	9.19	1.75 ^{b*}	1.69	1.80	<0.001
	Grande	60.25	2.77 ^d	2.71	2.83	<0.001
	Imperial	13.04	1.78 ^b	1.74	1.83	<0.001
	Leopardo	9.48	1.82 ^b	1.76	1.88	<0.001
	Page	31.67	1.44 ^a	1.42	1.46	<0.001
	Rivera	12.91	2.06 ^c	1.99	2.13	<0.001
Mancha bacteriana	Ball park	4.85	1.33 ^a	1.30	1.36	<0.001
	Grande	12.05	1.51 ^b	1.48	1.54	<0.001
	Imperial	2.45	1.23 ^a	1.20	1.27	<0.001
	Leopardo	38.36	1.76 ^d	1.74	1.79	<0.001
	Page	3.39	1.27 ^a	1.24	1.31	<0.001
	Rivera	24.46	1.63 ^c	1.60	1.65	<0.001
Virosis	Ball park	22.9	1.29 ^a	1.28	1.30	<0.001
	Grande	18.69	1.68 ^d	1.65	1.71	<0.001
	Imperial	30.92	1.43 ^c	1.42	1.45	<0.001
	Leopardo	18.86	1.76 ^c	1.73	1.79	<0.001
	Page	30.17	1.27 ^a	1.24	1.31	<0.001
	Rivera	20.67	1.39 ^b	1.37	1.41	<0.001
Cenicilla	Ball park	55.02	2.29 ^b	2.26	2.33	<0.001
	Grande	44.24	2.44 ^c	2.39	2.48	<0.001
	Imperial	9.84	1.62 ^a	1.58	1.66	<0.001
	Leopardo	37.58	2.43 ^c	2.38	2.48	<0.001
	Page	8.05	1.68 ^a	1.63	1.72	<0.001
	Rivera	79.85	3.5 ^c	3.42	3.57	<0.001

IC 95%=intervalo de confianza del 95%; C=constante; M=monitoreo; * los valores con distinta letra son estadísticamente diferentes por enfermedad.

7.2.5 Severidad de las enfermedades

La severidad de las enfermedades en todas las variedades durante el periodo de monitoreo fue variable (Tabla 5). El índice de severidad promedio del periodo de monitoreo de la marchitez en cada variedad, mostró que Page fue la más afectada con una severidad del 93.4%, seguido de la variedad Grande con un 90.6% y de Ball Park con un 88.6%. Por otra parte, las variedades menos afectadas fueron Imperial y Rivera, con un 75.9% y 75.8% de severidad, respectivamente.

La mancha bacteriana afectó de manera similar a todas las variedades durante el periodo de monitoreo. La variedad Leopardo presentó una mayor afectación con un 33.8% de severidad. Por otro lado, las variedades Page e Imperial, fueron las menos afectadas con un 22.8% y 20.7% de severidad, respectivamente. Así mismo, la virosis afectó de forma similar a todas las variedades durante el monitoreo. Sin embargo, Page fue la más afectada con un 45% de severidad e Imperial la menos afectada con un 36.2% de severidad. Finalmente, la cenicilla afectó a lo largo monitoreo en mayor medida a la variedad Ball Park con un 40.3%, mientras que la variedad Page, fue la menos afectada con un 12.6% de severidad.

Al analizar el promedio de severidad de las enfermedades por monitoreos, podemos observar que la marchitez registró el mayor rango de severidad con 69.2 a 93.9%. La virosis fue la segunda enfermedad con mayor rango de severidad de 37.5 a 44.3%. La mancha bacteria, presentó un rango de 23.9 a 34.5% de severidad. La cenicilla presentó un rango muy variable de severidad con valores de entre 4.2 a 50.3%, siendo ésta la que se presentó en mayor medida en los últimos cinco monitoreos (Tabla 5).

Al analizar de forma conjunta los resultados de incidencia y severidad de la marchitez del chile en las seis variedades, podemos observar que la variedad Grande fue la más afectada, debido a que presentó mayor porcentaje de plantas enfermas y la marchitez la afectó con una severidad alta. Así mismo, la variedad Page tuvo una severidad alta; sin embargo, la afección en las plantas fue mucho menor que la variedad grande. En contraste, la variedad Imperial presentó menor incidencia y la menor severidad en el cultivo.

El conocimiento de la incidencia y la severidad de la enfermedad, podría coadyuvar a la elección de la variedad que presente menor afectación por la marchitez.

Tabla 5. Comportamiento de severidad de enfermedades en seis variedades de chile jalapeño durante el ciclo agrícola 2017, Meoqui, Chihuahua.

Enfermedad	Variedad	Severidad (%)								Severidad media en todo el periodo
		Monitoreo								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
Marchitez	Ball park	88.1	89.2	91.3	87.0	86.3	82.4	90.5	93.8	88.6
	Grande	85.1	87.6	94.5	95.0	96.4	79.6	91.9	94.8	90.6
	Imperial	0.0	84.7	80.0	70.5	94.1	93.5	85.5	99.3	75.9
	Leopardo	66.7	88.9	74.9	71.8	72.2	78.2	92.4	94.3	79.9
	Page	94.3	95.8	91.7	92.5	90.2	96.9	92.0	93.8	93.4
	Rivera	81.0	87.0	62.7	62.1	65.8	72.9	88.0	87.3	75.8
SMM*		69.2	88.9	82.5	79.8	84.2	83.9	90.0	93.9	
Mancha bacteriana	Ball park	27.7	25.7	25.7	25.6	25.4	25.3	25.4	25.0	25.7
	Grande	36.2	28.5	25.5	25.3	28.1	27.6	25.7	30.5	28.4
	Imperial	20.0	20.3	20.6	20.6	22.7	20.2	20.2	21.1	20.7
	Leopardo	25.0	25.0	25.0	26.7	25.4	35.2	40.2	67.6	33.8
	Page	22.9	20.7	21.0	20.9	20.0	26.3	25.2	25.5	22.8
	Rivera	25.0	25.0	25.8	25.0	25.0	30.6	30.4	37.4	28.0
SMM		26.1	24.2	23.9	24.0	24.4	27.5	27.8	34.5	
Virosis	Ball park	46.7	44.2	47.2	49.1	39.3	40.2	36.4	37.9	42.6
	Grande	41.3	41.1	44.0	44.1	46.5	39.0	38.6	43.3	42.2
	Imperial	0.0	41.0	47.3	45.0	38.1	38.2	38.0	41.7	36.2
	Leopardo	50.0	48.3	39.5	43.2	36.5	37.4	38.6	40.6	41.8
	Page	52.8	43.6	47.3	46.3	42.8	42.1	42.2	43.0	45.0
	Rivera	34.3	43.0	37.1	38.3	39.5	42.7	35.2	41.8	39.0
SMM		37.5	43.6	43.7	44.3	40.5	39.9	38.2	41.4	
Cenicilla	Ball park	0.0	25.0	25.0	25.0	25.3	85.6	70.1	66.8	40.3
	Grande	0.0	0.0	0.0	39.6	27.7	55.0	47.3	46.0	27.0
	Imperial	0.0	0.0	0.0	20.1	20.1	20.7	20.2	34.6	14.5
	Leopardo	0.0	0.0	0.0	29.9	27.2	47.4	38.7	51.2	24.3
	Page	0.0	0.0	0.0	20.0	20.1	20.3	20.2	20.5	12.6
	Rivera	0.0	0.0	0.0	26.6	26.2	73.0	62.3	58.4	30.8
SMM		0.0	4.2	4.2	26.9	24.4	50.3	43.1	46.3	

*SMM=severidad media por monitoreo

7.2 Agente causal de la mancha bacteriana

Los agentes causales de la mancha bacteriana del chile en la zona productora de chile de Lázaro Cárdenas, municipio de Meoqui, Chihuahua, fueron identificados como *X. perforans* y *X. euvesicatoria*. Del total de las muestras tomadas en campo se aislaron 43 bacterias, las cuales, exhibieron características del género *Xanthomonas*. Los aislamientos mostraron colonias de color amarillo, mucoides, circulares y convexas, las cuales coinciden con los descrito por la Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal (EPPO, 2013; Figura 6).

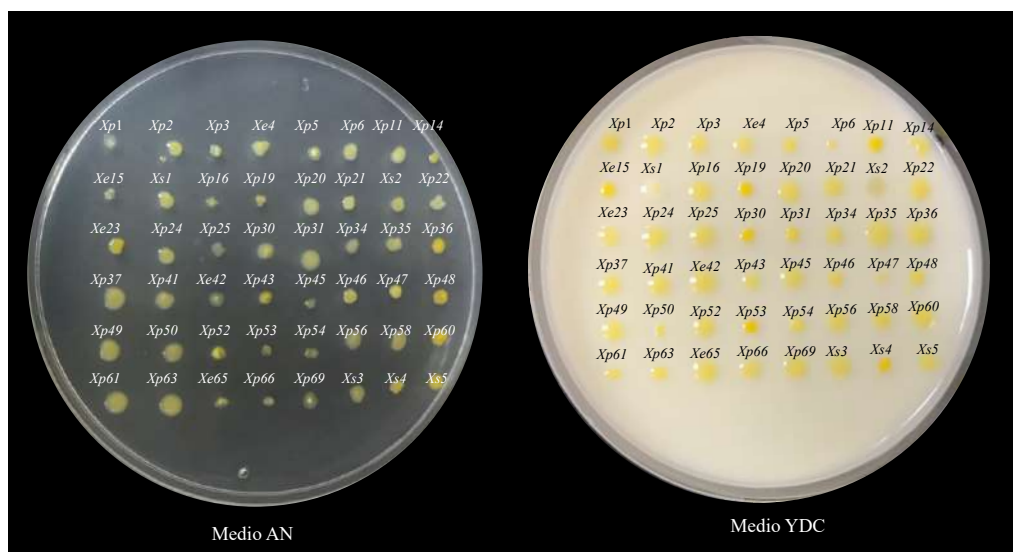


Figura 6. Morfología colonial de *Xanthomonas perforans* (Xp) y *X. euvesicatoria* (Xe). Medio agar nutritivo (AN) y medio levadura-dextrosa- carbonato de calcio (YDC) a las 24 h de incubación a 28 °C. Xs=bacteria no identificada.

Los resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación *Xanthomonas*, resultaron negativas para la tinción de Gram y positivas para las pruebas de crecimiento a 35 °C, crecimiento en YDC y SX, así como pruebas de KOH y catalasa, además de presentar forma bacilar al observarse al microscópio. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Schaad et al. (2001) y Umesha y Avinash (2015). Además, 37 aislamientos (87%) mostraron una fuerte actividad amilolítica, característica asociada con la especie *X. perforans*, mientras que 6 aislamientos (14%) no poseían actividad amilolítica característica relacionada con *X. euvesicatoria* (Stall et al.1994; Jones et al. 2004; Barak et al. 2016).

7.3 Caracterización molecular del agente causal

Los aislamientos de *Xanthomonas* spp. encontrados en las muestras de plantas chile con la sintomatología de la mancha bacteriana, que se caracterizaron con pruebas bioquímicas, fueron identificados molecularmente por medio de la técnica de PCR múltiple como *X. perforans* y *X. euvesicatoria*. Lo anterior fue confirmado con la presencia del amplifon de 197 pb de DNA en 37 aislamientos con *primers* específicos Bs-XpF/Bs-XpR para *X. perforans* y la amplificación del fragmento de 197 pb de seis aislamientos con *primers* específicos Bs-XeF / Bs-XeR de *X. euvesicatoria*. No se observó amplificación para los controles negativos y otros pares de *primers* específicos para *X. vesicatoria* o *X. gardneri* (Figura 7).

Xanthomonas perforans no ha sido reportado como agente causal de la mancha bacteriana del chile en Chihuahua, México. Estudios anteriores han demostrado que *X. euvesicatoria* o *X. campestris* pv. *vesicatoria* [nombre antes de la reclasificación de Jones *et al.* (2004)] pueden ser agentes causales de esta enfermedad (López y González 2001; Chávez-Dozal *et al.* 2012; Robles-Hernández *et al.* 2017). Además, recientemente se aislaron cepas de *X. perforans* de plantas de chile en EE. UU., lo que sugiere una expansión nueva de esta especie, lo que implica una amenaza emergente para la producción de este cultivo (Potnis *et al.* 2015; Newberry *et al.* 2019). Esto podría deberse al flujo continuo de genes entre *Xanthomonas* relacionadas con varias plantas hospedadoras, lo que puede resultar en la aparición de nuevas cepas de patógenos con el potencial de afectar a otros hospederos (Newberry *et al.* 2019).

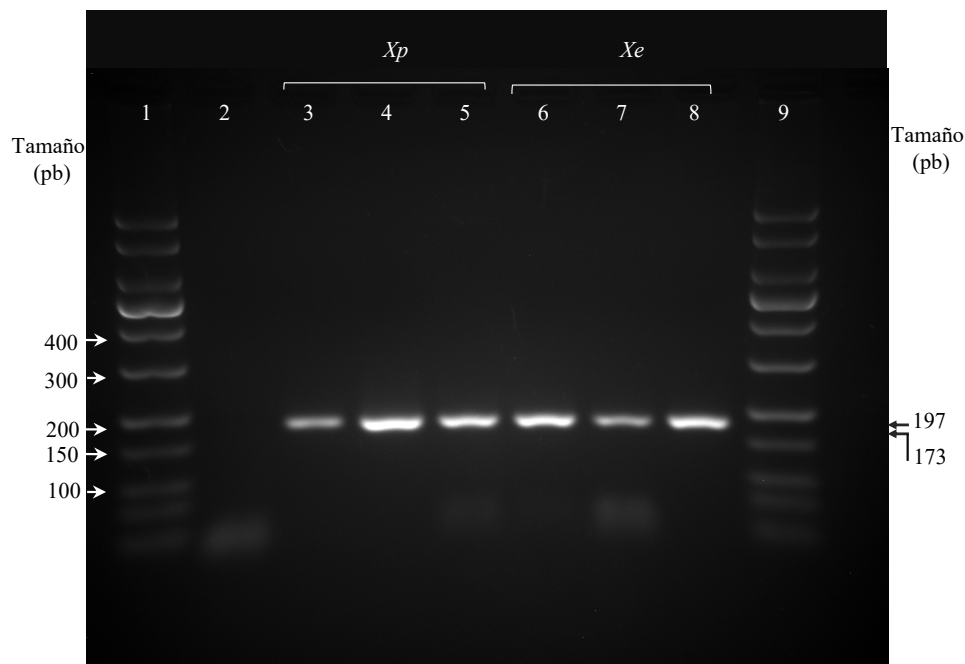


Figura 7. Identificación molecular de *Xanthomonas* spp. por PCR. Gel de agarosa de la reacción en cadena de la polimerasa multiplex obtenida con pares de primers específicos para *Xanthomonas euvesicatoria* BsXeF / BsXeR, *X. vesicatoria* BsXvF / BsXvR, *X. gardneri* BsXgF / BsXgR y *X. perforans* BsXpF / BsXpR. Carriles 1 y 9: marcador de peso molecular 50 pb Low Range DNA Ladder. Carril 2: control negativo. Carril 3 a 5: *X. perforans*. Carril 6 a 8: *X. euvesicatoria*.

Después de analizar la filogenia de cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* contra la taxonomía de especies de *X. axonopodis*, se propuso una reclasificación de *X. perforans* y *X. euvesicatoria* como la misma especie de *Xanthomonas* (Constantin et al. 2016). De hecho, los autores recomendaron enmiendas taxonómicas para *X. citri*, *X. phaseoli* y *X. axonopodis* para abarcar a las cepas PG I, PG III y PG IV, respectivamente; y la reclasificación de *X. perforans* y *X. alfalfae* como *X. euvesicatoria*, para abarcar a todas las cepas de *X. euvesicatoria* como cepas PG II. Además, se ha modificado recientemente la reclasificación de *X. campestris* pv. *vitians* (Morinière et al. 2020).

7.4 Pruebas de patogenicidad y virulencia

Todos los aislamientos de *X. perforans* y *X. euvesicatoria* causaron síntomas característicos de la mancha bacteriana en plántulas de chile jalapeño bajo condiciones

controladas. Los síntomas en las hojas inoculadas con los aislamientos bacterianos aparecieron a los 5 y 10 días después de la inoculación y se caracterizaron por la presencia de manchas acuosas, hojas con clorosis y/o perforación de la lámina foliar, manchas necróticas con clorosis y defoliación, concordando con lo reportado por Hassan y Zyton (2017). Las plantas de control negativo permanecieron sanas (Figura 8). Los resultados de las pruebas de patogenicidad demostraron que las cepas de *X. perforans* y *X. euvesicatoria* infectan al cultivo de chile y causan la mancha bacteriana como se ha reportado anteriormente (Jones et al. 2004; Hassan y Zyton 2017; Newberry et al. 2019).

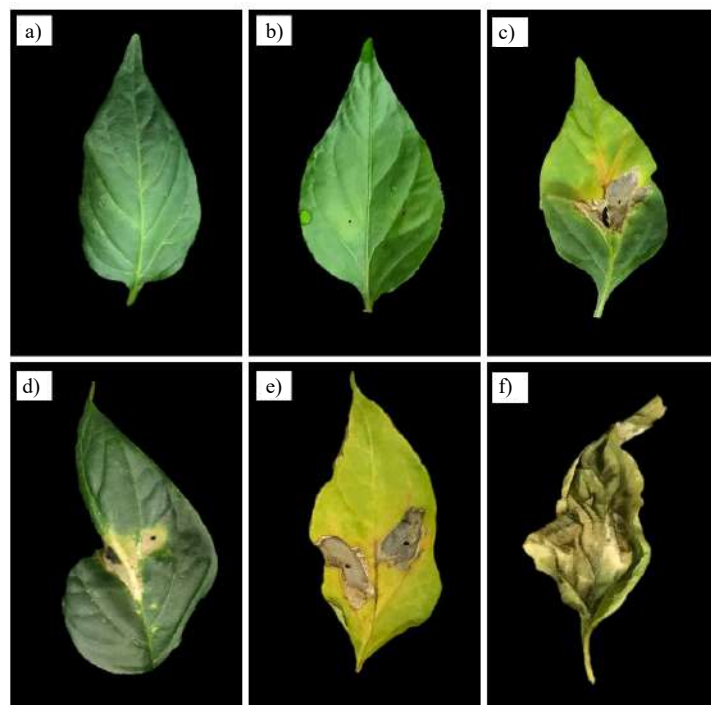


Figura 8. Síntomas inducidos por aislamientos de *Xanthomonas* en hojas de chile jalapeño a los 10 días después de inoculación. a) hoja sana tratada con solución salina al 0.25%, b) manchas acuosas, c) necrosis con amarillamiento y ruptura de lámina foliar, d) manchas necróticas con deformación foliar, e) manchas necróticas con clorosis y f) caída de hoja y necrosis.

Para el análisis de la virulencia de los aislamientos se aplicó un análisis multivariado de conglomerados y se categorizaron las cepas en grupos con severidad baja, media y alta, de acuerdo con su virulencia en las fechas de evaluación (5 y 10 días). El 9.3% de los aislamientos (todos *X. perforans*) causaron el mayor daño a las hojas de chile, desde los 5 días hasta el final de la evaluación, con una severidad final del 92.58 %. Además, el 25.58% de los aislamientos (diez *X. perforans* y uno *X. euvesicatoria*) causaron daño

medio con 76.75% de severidad final, y el 65.11% (23 aislamientos identificados como *X. perforans* y 5 como *X. euvesicatoria*) indujeron daño bajo con 29.83% de severidad (Tabla 6). Los grupos de severidad media y severidad baja mostraron incrementos de 54.0% y 13.9% en hojas de chile al día 10, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de la severidad de aislamientos de *Xanthomonas perforans* y *X. euvesicatoria* en plántulas de chile Jalapeño variedad Grande.

Conglomerado	Descripción de la severidad	Aislamientos	Severidad (%)		Aislamientos ^b
			5 días ^a	10 días	
1	Alto	4	67.46	92.58	<i>Xp21, Xp47, Xp60, Xp69</i>
2	Medio	11	22.72	76.75	<i>Xp19, Xp24, Xp25, Xp34, Xp43,</i>
					<i>Xp45, Xp48, Xp50, Xp61, Xe65, Xp66</i>
3	Baja	28	15.90	29.83	<i>Xp1, Xp2, Xp3, Xe4, Xp5, Xp6,</i>
					<i>Xp11, Xp14, Xe15, Xp16, Xp20, Xp22, Xe23, Xp30, Xp31, Xp35, Xp36, Xe37, Xp41, Xe42, Xp46, Xp49, Xp52, Xp53, Xp54, Xp56, Xp58, Xp63</i>

^a Días después de la inoculación

^b *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe) and *X. perforans* (Xp)

La razón de analizar la severidad provocada por los aislamientos por conglomerados, fue para agrupar a los 43 aislamientos según su potencial de virulencia (alta, media o baja), con el fin de seleccionar aquellos de diferentes grupos de virulencia para evaluar su susceptibilidad a los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados en el área de estudio. Esto es importante desde el punto de vista epidemiológico, ya que el chile es uno de los cultivos más importantes en Chihuahua, México con una producción de 676,463 toneladas al año (SIAP 2019). La presencia de *X. perforans* en plantas de chile jalapeño en el centro sur de Chihuahua, podría deberse a la importación de semillas

contaminadas, que es un mecanismo común de propagación de este patógeno (Moura et al. 2020).

7.5. Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos

Las cepas de *Xanthomonas* evaluadas fueron resistentes a CuS, CuG en todas las concentraciones. Sin embargo, todas las cepas fueron susceptibles a Cu + Ox > 32 µg/mL. Además, las cepas no crecieron en Gen + Ox o Gen a 32 µg/mL. El crecimiento de Xp47 y Xp60 (las cepas más virulentas) fue inhibido por Cu + Ox a 4 µg/mL. En general, el 47% de las cepas no crecieron cuando se expusieron a Gen > 4 µg/mL. Dado que las cepas de *Xanthomonas* eran resistentes a CuS y CuG, no se pudo determinar la CMI. La CMI calculada de Cu + Ox fue de 4 µg/mL a 32 µg/mL, la CMI de GenS fue de 4 µg/mL a 32 µg/mL y para Gen + Ox fue de 32 µg/mL (Tabla 7).

Varios estudios reportan la resistencia al cobre por parte de *Xanthomonas* spp. asociadas a la mancha bacteriana en chile y tomate (Carrillo-Fasio et al. 2001; Martin et al. 2004; Quezado et al. 2005; Abbasi et al. 2015; Carvalho et al. 2019; Roach et al. 2020; Taylor et al. 2020; Valarmathi 2020). Los aislamientos de *Xanthomonas* fueron resistentes a compuestos a base de cobre, ya que todos crecieron a concentraciones de Cu tan altas como 640 µg/mL, que es tres veces mayor que el considerado como indicador de resistencia de acuerdo con Roach et al. (2020) (200 µg/mL).

La inhibición del crecimiento de los aislamientos de *Xanthomonas* por la combinación de cobre y oxitetraciclina fue mayor que la de Gen + Ox. Esto podría deberse al sinergismo entre agentes químicos, que se ha reportado en otros estudios relacionados con la resistencia al cobre de la mancha bacteriana del chile, mostrando *X. euvesicatoria* y *X. campestris* pv. *vesicatoria* susceptible a compuestos de cobre (de Aguiar et al. 2003; Areas et al. 2018). Además, todos los aislamientos mostraron susceptibilidad a la oxitetraciclina a Gen + Ox y el 47% fueron completamente inhibidos por Gen.

Tabla 7. Susceptibilidad de cepas de *Xanthomonas* asociadas con la mancha bacteriana del chile a compuestos a base de cobre, oxitetraciclina y gentamicina¹

Compuestos	Conc. (µg/mL)	Virulencia de <i>Xanthomonas</i>												CMI	
		Baja				Media					Alta				
		<i>Xe4</i>	<i>Xp16</i>	<i>Xp3</i>	<i>Xp11</i>	<i>Xp25</i>	<i>Xp43</i>	<i>Xp48</i>	<i>Xp50</i>	<i>Xp6</i>	<i>Xp21</i>	<i>Xp47</i>	<i>Xp60</i>		<i>Xp69</i>
Sulfato de cobre	640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Glucob Plus® (8% gluconate de cobre + 1% ácido cítrico)	640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Coboxy® (45% Oxicloruro de cobre + 37.7% clorhidrato de oxitetraciclina)	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	4-32
	8	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	
	16	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Final Bacter® (6% Oxitetraciclina + 2% Gentamicina)	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sulfato de Gentamicina	4	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	4-32
	8	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	
	16	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

¹Las concentraciones probadas más altas o más bajas que muestran el mismo resultado que la última, no se muestran.

^a*Xanthomonas euvesicatoria* (*Xe*) y *X. perforans* (*Xp*); sin crecimiento bacteriano (-); crecimiento bacteriano regular en TSB (+); CMI= concentración mínima inhibitoria. ND= valor no determinado.

La resistencia a la oxitetraciclina por los aislamientos difiere de lo reportado por Farfán et al. (2014), quienes encontraron que *Xanthomonas sp.* es resistente a Ox a < 25 µg/mL. Sin embargo, Quezado et al. (2005) no detectaron resistencia de *X. perforans* asociado a la mancha bacteriana del chile a este compuesto, que se usa comúnmente para controlar la enfermedad de la mancha bacteriana del durazno y la nectarina causada por *X. arboricola* pv. *pruni* (Sundin y Wang 2018; Raman et al. 2020). Por otro lado, ninguno de los aislamientos analizados en este estudio mostró resistencia a la gentamicina, en contraste con los reportado por Rojas et al. (2019) quienes identificaron aislamientos de *X. campestris* de repollo y frijol con resistencia a la gentamicina de 25 µg/mL a 100 µg mL.

7.6. Detección de genes de resistencia al cobre

En la mayoría de las cepas de *Xanthomonas* que mostraron resistencia al cobre en la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos, se detectó la presencia de los genes *copLAB*, los cuales están asociados a la resistencia al cobre en *Xanthomonas* spp (Behlau et al. 2020). Los genes *copL*, *copA* y *copB* tienen un peso molecular de 356, 870 y 531 pb, respectivamente y se demostró su presencia en las bacterias fitopatógenas mediante su amplificación por PCR (Figura 9). Sin embargo, no se detectaron genes *copLAB* en la cepa *Xp3*.

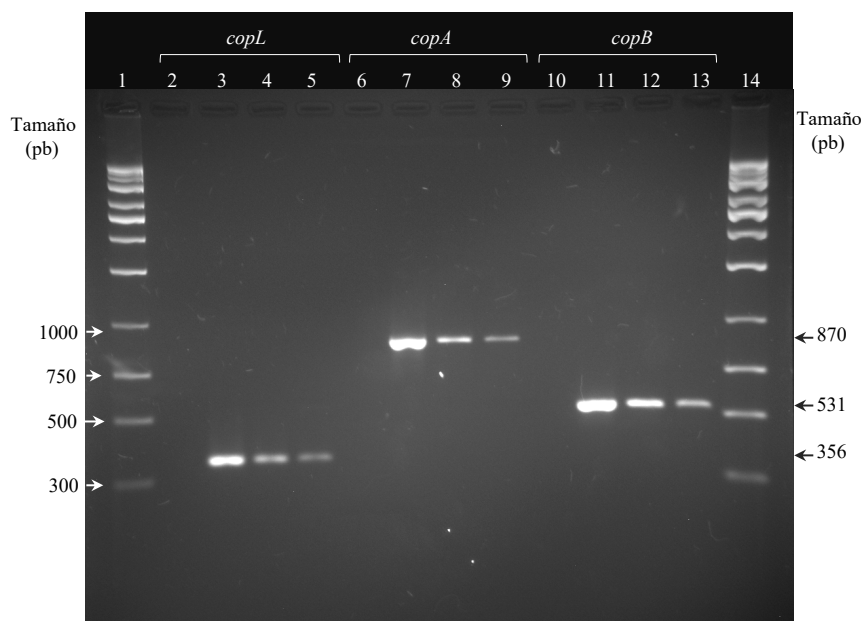


Figura 9. Detección de genes de resistencia al cobre en *Xanthomonas* spp. por PCR. Gel de agarosa de la reacción en cadena de la polimerasa de la resistencia al cobre por los genes *copL*, *copA* y *copB*. Carriles: 1 y 14 marcador de peso molecular 1000-bp DNA step ladder; 2, 6 y 10 control negativo; 3, 7 y 11 genes *copL*, *copA*, y *copB* de *Xanthomonas campestris* ATCC 1395, respectivamente; 4, 8, and 12 genes *copL*, *copA* y *copB* de *X. perforans* Xp48, respectivamente; 5, 9 y 13 genes *copL*, *copA* y *copB* de *X. perforans* Xp60, respectivamente.

Estudios previos muestran que los genes *copLAB* regulan la acumulación de cobre en el medio a través de la generación de proteínas de unión al elemento, este mecanismo de resistencia es el principal en *Xanthomonas* (Cooksey 1994, Voloudakis et al. 2005) *copLAB* ha sido identificado como un operón donde el gen regulador es *copL* y los genes *copA* y *copB* codifican proteínas de unión al cobre (Cooksey 1994; Voloudakis et al.

2005). En este estudio, las cepas presentaron genes *copLAB*, lo que explicaría su crecimiento en las concentraciones altas cobre en medio líquido (640 µg/mL). Por otro lado, la cepa Xp3, aunque no presentó los genes *copLAB*, fue resistente al cobre. Esto podría deberse a que bacterias ambientales como *Xanthomonas* han desarrollado mecanismos de resistencia al cobre basados en la homeostasis como resultado de la interacción constante con el cobre, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente (Brown et al. 1992; Martínez-Bussenius et al. 2017).

7.7 Aislamiento e identificación de bacterias del género *Bacillus*

El procesamiento de las muestras de suelo permitió aislar y purificar 22 cepas bacterianas con características morfológicas propias del género *Bacillus*. Las bacterias crecieron con colonias grandes, de forma circular, con bordes enteros a ondulados, con texturas opacas, suaves y con poca elevación; además presentaron colores con variaciones entre gris claro o cremoso a blanquecino (Figura 10).

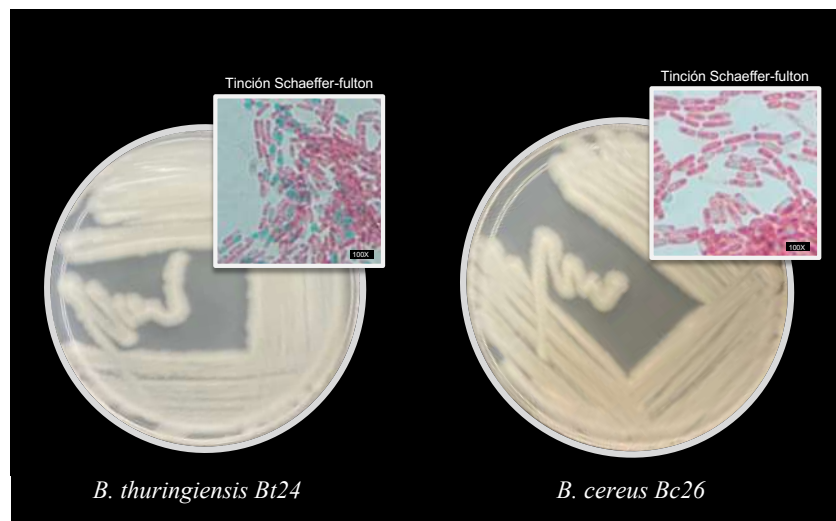


Figura 10. Morfología macroscópica y microscópica de cepas de *Bacillus* crecidas en medios de agar nutritivo incubadas por 48 horas.

Por otra parte, las bacterias presentaron forma bacilar, resultaron positivas a la tinción de Gram y tinción de Schaeffer-fulton, indicando la presencia de endosporas. Así mismo, fueron positivas a la prueba de motilidad. Además, las cepas fueron negativas a la prueba de KOH. Estas características corresponden con lo reportado por Calvo y Zúñiga (2010) y Logan y De Vos (2015).

7.8. Caracterización molecular de *Bacillus*

Los aislamientos de *Bacillus* spp. que obtuvieron los mejores resultados en el ensayo de promoción del crecimiento vegetal (Tabla 8), fueron identificados molecularmente por medio de la técnica de PCR múltiplex como *B. thuringiensis* y *B.cereus* (Figura 11). Lo anterior fue confirmado con la amplificación de los fragmentos de 400 y 299 pb de DNA en un aislamiento, con cebadores específicos para *B. thuringiensis* y la amplificación de los fragmentos de 400 y 475 pb en seis aislamientos con cebadores específicos para *B. cereus*, lo cual concuerda con lo reportado por Park et al. (2007) y Sadeghi et al. (2012). No se observó amplificación para los controles negativos y otros pares de cebadores específicos para *B. anthraxis*, *B. licheniformis* *B. mycoides* y *B. subtilis*.

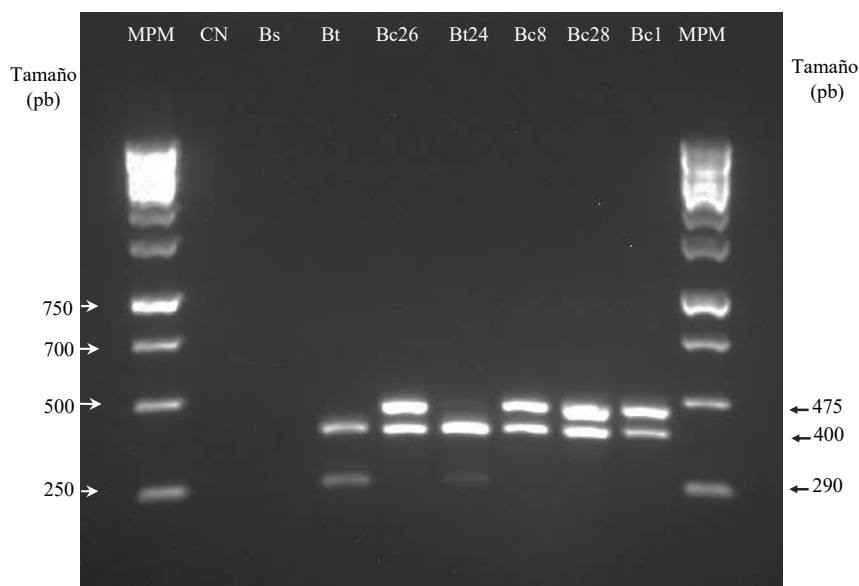


Figura 11. Identificación molecular de *Bacillus* spp. por PCR. Gel de agarosa de la reacción en cadena de la polimerasa obtenida con pares de cebadores específicos para *Bacillus* spp. Carriles: MPM=marcador de peso molecular 120 pb Low Range DNA Ladder; CN= control negativo, Bs=*Bacillus subtilis*, Bt=*Bacillus thuringiensis* (400 y 299 pb), *Bacillus cereus* (475 y 400 pb), B26 a B1= aislamientos.

7.9 *Bacillus* spp. como promotores del crecimiento vegetal

Los aislamientos de *Bacillus* spp. indujeron un efecto positivo sobre los parámetros vegetativos evaluados en las plántulas de chile. Las bacterias se agruparon en tres clusters de acuerdo con un análisis multivariado de conglomerados para determinar su efecto sobre la promoción del crecimiento vegetal (Tabla 8). Cluster 1, grupo de

bacterias con los mejores resultados de promoción de crecimiento vegetal pero con solo dos aislamientos (Bc26 y Bc8). Closter 2, grupo con un apromoción del crecimiento vegetal medio y con 19 aislamientos. Closter 3, grupo con una promoción del crecimiento vegetal similar al control, pero con dos aislamientos (Bsp5-4 y Bsp7-3). Cabe mencionar que el producto Serenade® se ubicó en el closter de promoción del crecimiento vegetal medio. Por otra parte, el desarrollo de las plántulas en todos los tratamientos tuvieron un crecimiento similar al control, con una anatomía normal, pero con un desarrollo mayor dependiendo del tratamiento (Figura 12)

Tabla 8. Análisis de conglomerados de la promoción del crecimiento de plántulas de chile inoculadas con aislamientos de *Bacillus* spp. al día 40 después de la inoculación.

Closter	Área foliar (cm ²)	Altura (cm)	Diámetro de tallo (mm)	Longitud de raíz (cm)	Número de hojas	Biomasa seca (gr)			Aislamientos
						Raíz	Tallo	Hoja	
1	52.19	17.48	2.23	8.18	10.15	0.08	0.30	0.19	Bc26, Bc8
2	44.58	15.96	1.95	7.97	9.52	0.05	0.22	0.14	Bsp5, Bsp19, Bsp21, Bc28-5, Bsp25, Bsp9, Bsp5-5, Bc28-2, Bt24, Bsp26-1, Bsp21, Bsp15, Bsp29-4, Bc13, Bsp2, Bsp24-3, Bsp7, Bc1, Serenade®
3	37.34	13.60	2.08	7.93	8.77	0.04	0.17	0.11	Control, Bsp5-4, Bsp7-3

Coficiente cofenético 0.764



Figura 12. Efecto de aislamientos de *Bacillus* sp., en plántulas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero. Control= plantas solo fertilizadas, *Serenade*®= producto comercial con *Bacillus subtilis*.

El efecto de *Bacillus* spp. sobre la inducción del crecimiento vegetal se ha reportado en varios cultivos hortícolas (Saxena et al. 2017; Kashyap et al. 2019). Para el caso del cultivo de chile, algunos estudios muestran que al aplicar en semillas o plántulas de chile especies como *B. amyloliquefasciens*, *B. pumilus* y *B. velezensis*, pueden incrementar ciertos parámetros de crecimiento como altura, diámetro de tallo, número de hojas, biomasa fresca y biomasa seca (Joo et al. 2004, Aguilar et al. 2017, Jiang et al, 2018).

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal empleados por los *Bacillus* spp. en el desarrollo de las plántulas de chile en este ensayo, fueron probablemente la fijación biológica del nitrógeno, la solubilización de fósforo y/o la producción de fitohormonas, ya que estos se han elucidado y definido como los principales en este tipo de bacterias (Goswami 2016, Saxena et al. 2017, Riaz et al. 2021). Los resultados positivos obtenidos en este ensayo, corrobora el potencial de los *Bacillus* spp. aislados de suelo, como bacterias promotoras de crecimiento vegetal en el chile.

7.10 Confrontación directa *in vitro* de *Bacillus* vs. *Xanthomonas* spp.

La inhibición de *Xanthomonas* spp. más virulentas por acción de la confrontación directa con los aislamientos de *Bacillus* spp. fue similar, ya que todas las bacterias benéficas lograron inhibir el crecimiento de las bacterias fitopatógenas, mostrándose un efecto bactericida del 100% a las 72 h de la confrontación (Figura 13).

Todas los aislamientos de *Bacillus* mostraron un efecto bactericida sobre las *Xanthomonas* spp., desde las 24 h de confrontación hasta el final de la evaluación. Sin embargo, solo la *X. campestris* ATTC1395 fue inhibida por el 63.3% de los *Bacillus* a las 24 h de interacción, pero a partir de las 48 hr también se inhibió su crecimiento totalmente.

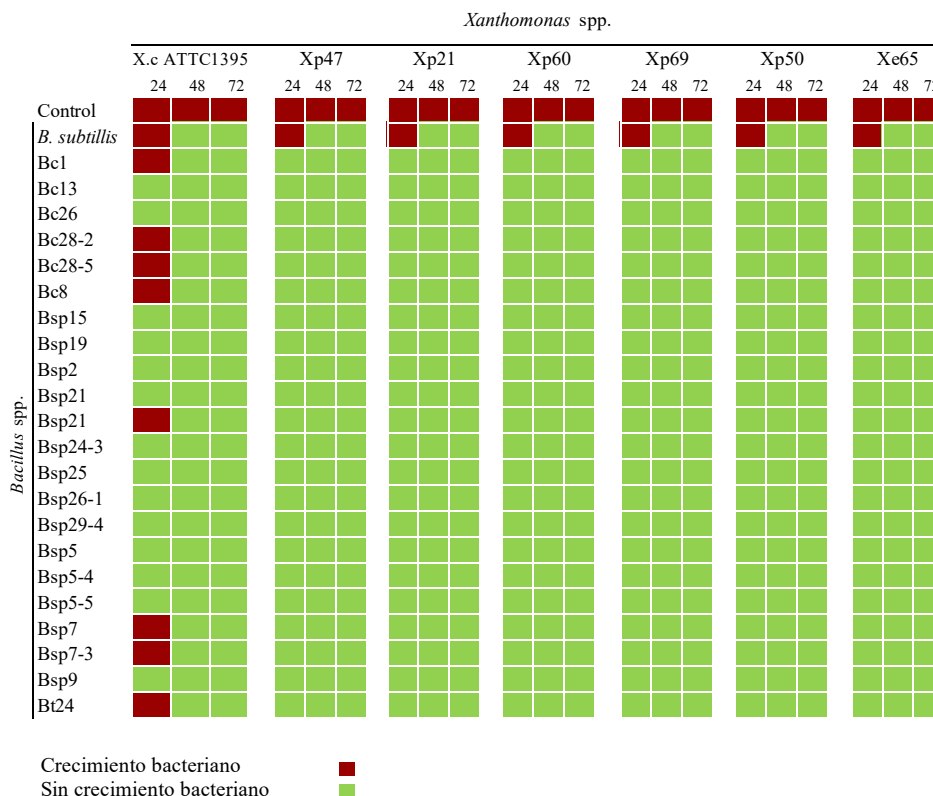


Figura 13. Inhibición del crecimiento *in vitro* de aislamientos de *Xanthomonas* spp. por aislamientos de *Bacillus* spp.

La inhibición del crecimiento de los *Xanthomonas* por parte del antagonista puede deberse la capacidad de *Bacillus* spp. para sintetizar diversos metabolitos secundarios que tienen propiedades antimicrobianas. La síntesis de lipopéptidos cíclicos (PLC) de las familias surfactinas, iturinas y fengicinas, han sido ampliamente documentadas como

compuestos antimicrobianos producidos por *Bacillus* spp. (Ongena y Jacques 2008; Raaijmakers et al. 2010; Cochrane y Vederas 2016). La actividad antibacteriana de los PLC contra fitopatógenos como *X. campestris*, se ha atribuido principalmente a las iturinas y surfactinas (Zhao et al. 2018) y recientemente a las fengicinas (Medeot et al. 2020). Por ejemplo, se ha reportado que *B. subtilis* SSE4 produce iturinas que han mostrado actividad antibacteriana contra *X. campestris* (Thasana et al. 2010). Así mismo, Grandy et al. (2019) encontraron que *B. velezensis* es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de *X. campestris* y *X. euvesicatoria*, por la acción de surfactinas, las cuales se insertan en las membranas celulares bacterianas, solubilizando la bicapa de fosfolípidos y creando poros y canales iónicos, provocando la muerte celular (Hamley 2015, Zhao 2017). Medeot et al. (2020) indicaron que la exposición a la fenguicina producida por *B. amyloliquefaciens*, causa alteraciones en la topografía de las células de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, que resultan en la muerte celular por filtración del contenido intracelular.

Por otra parte, la inhibición del crecimiento *in vitro* de *Xanthomonas* por *Bacillus* spp. pudiera deberse a la competencia por espacio y nutrientes entre ambas bacterias, ya que se ha reportado como otro de los mecanismos de control biológico empleado por *Bacillus* spp. (Chen et al. 2020; Pedraza et al. 2020). La competencia entre especies provoca una reducción del crecimiento, la productividad y otras actividades de los organismos competidores (Shafi et al. 2017). La capacidad de *Bacillus* de aprovechar más rápido los nutrientes y espacio del medio de cultivo en las interacciones con *Xanthomonas* spp. en este ensayo, se evidenció al momento de las resiembras cada 24 h ya que solo crecieron colonias de *Bacillus* durante todo el periodo de evaluación, excepto a las 24 h en las interacciones con *X. campestris* ATCC1395.

7.11 Biocontrol de la mancha bacteriana en condiciones controladas

La aplicación de aislamientos de *Bacillus* sp. como inductores de resistencia y como control directo de la mancha bacteriana en plantas de chile mostraron comportamientos diferentes en cada caso. La aplicación en maceta de aislamientos de *Bacillus* spp. como inductores de resistencia a la mancha bacteriana presentaron diferencias ($p < 0.05$) en los resultados del biocontrol de *X. euvesicatoria* y *X. perforans*.

al día 23 de su empleo. En el caso de *X. euvesicatoria*, la inhibición del daño foliar fue de entre 15.9 a 39.3% (Figura 14a). Los tratamientos de Bc8 y el producto comercial Serenade® mostraron los mejores resultados con un promedio de 38.2% de inhibición. Por otro lado, los tratamientos Bc28-2, Bc28-5 y Bc26, indujeron inhibiciones similares al producto comercial Fitofort®, el cual inhibió la enfermedad un 23.4%. En contraste, solo el tratamiento Bc13 indujo la menor inhibición (15.9%), estando solo un 8.1% por debajo del producto comercial Fitofort®. La inhibición del daño causado por *X. perforans* fue de entre 25.7 a 51.2% (Figura 14b). El producto comercial Fitofort® indujo la mayor inhibición de la enfermedad con una media de 51.2%. Además, los tratamientos Bc1, Bc8 y Bc28-5 indujeron una inhibición media de 39.06%, siendo ligeramente superior al producto Serenade®, los cuales inhibieron un 35.9%. El tratamiento B26 indujo la menor inhibición (25.7%), estando un 28.41% por debajo de Serenade®.

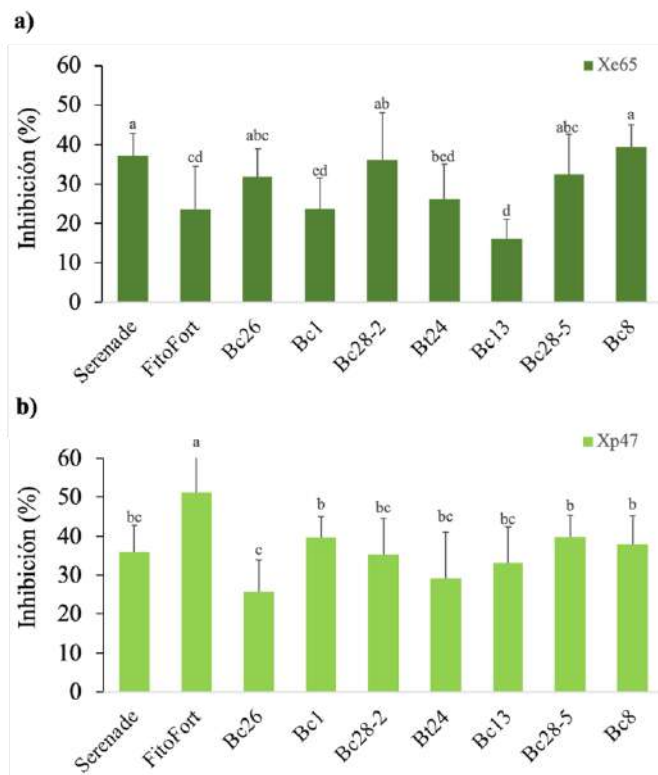


Figura 14. Inhibición de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* (a) y *X. perforans* (b) en plantas de Chile por aislamientos de *Bacillus* sp. bajo condiciones controladas. Barras con la misma letra no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) Tukey ($n=4$). Serenade®= producto comercial para el control de *Xanthomonas* sp., Fitofort®= producto comercial para inducir de resistencia en enfermedades en hortalizas, Bc= cepas de *Bacillus cereus*, Bt= cepa de *Bacillus thuringiensis*, Xe = cepa de *X. euvesicatoria*, y Xp = cepa de *X. perforans*.

Todos los tratamientos con las interacciones entre *X. euvesicatoria* y *X. perforans* con *Bacillus* spp. presentaron síntomas característicos de la mancha bacteriana, pero de forma variada, dependiendo el tratamiento y su inhibición. Los síntomas se caracterizaron por la presencia de manchas necróticas con bordes cloróticos, hojas con áreas con clorosis y/o perforación de la lámina foliar, manchas necróticas con clorosis (Figura 15).

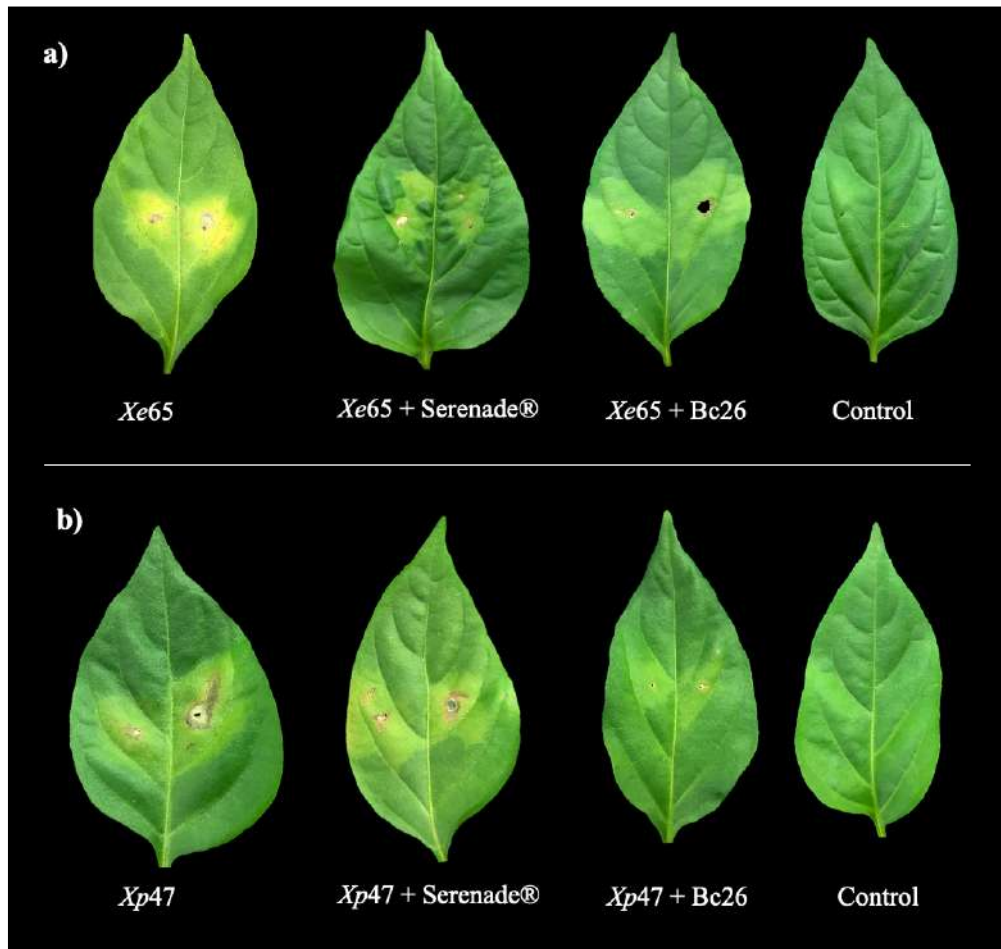


Figura 15. Inhibición de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* y *X. perforans* en plantas de chile por aislamientos de *Bacillus* sp. como inductores de resistencia bajo condiciones controladas. (a) Imágenes representativas de las interacciones entre *X. euvesicatoria* (*Xe65*) y *Bacillus* spp. (*Serenade®* y *Bc26*). (b) Imágenes representativas de las interacciones entre *X. perforans* (*Xp47*) y *Bacillus* spp. (*Serenade®* y *Bc26*). Los controles fueron infiltraciones foliares con solución salina 0.85%.

La aplicación directa al follaje de las plantas de chile con *Bacillus spp.*, previo a la inoculación con las *Xanthomonas sp.*, mostró una inhibición total de la enfermedad al día 23 después de la aplicación del patógeno. Sin embargo, al realizar el aislamiento del patógeno se pudo encontrar aún en algunos tratamientos (Tabla 9).

Todos los tratamientos bacterianos de biocontrol y el inductor de resistencia FitoFort evitaron el desarrollo de la mancha bacteriana en las plantas de chile. Por otro lado, las plantas tratadas sólo con los patógenos presentaron la enfermedad, caracterizada por la presencia de pequeñas manchas cloróticas en la lámina foliar (Figura 16).

Tabla 9. Inhibición de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* y *X. perforans* en plantas de chile por aislamientos de *Bacillus sp.* bajo condiciones controladas.

Tratamiento	<i>Xanthomonas sp.</i>			
	<i>Xe65</i>		<i>Xp47</i>	
	SF ¹	PPF ²	SF	PPF
Serenade®	-	-	-	-
FitoFort®	-	+	-	+
Bc26	-	-	-	-
Bc1	-	-	-	-
Bc28-2	-	-	-	-
Bt24	-	+	-	-
Bc13	-	-	-	-
Bc28-5	-	-	-	-
Bc8	-	+	-	-
Patógeno	+	+	+	+
Control absoluto	-	-	-	-

¹SF= síntomas foliares; presencia de manchas foliares (+) y ausencia de manchas foliares (-). ²PP=presencia del patógeno en follaje; el signo + indica el crecimiento del patógeno en medio levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC) a las 24 h de incubación a 28 °C, aislado de muestras foliares de los tratamientos y el signo - indica la ausencia de crecimiento del patógeno en medio YDC. Xe= *Xanthomonas euvesicatoria*, Xp=*Xanthomonas perforans*, Serenade®= producto comercial para el control de *Xanthomonas sp.*, FitoFort® =producto comercial para inducir de resistencia en enfermedades en hortalizas, Bc= cepas de *Bacillus cereus*, Bt= cepa de *Bacillus thuringiensis*, Control absoluto= aplicación de solución salina (0.85%).

Los resultados del aislamiento de los patógenos de cada tratamiento mostraron que el producto comercial FitoFort no permitió el desarrollo de la enfermedad, pero se encontró la presencia de las dos *Xanthomonas* en el follaje de cada tratamiento. Así mismo, los

tratamientos Bc8 y Bt24, no desarrollaron la enfermedad pero se encontró la presencia de *X. euvesicatoria* en sus follajes. Lo anterior, puede deberse a la capacidad de *X. perforans* y *X. euvesicatoria* de sobrevivir en la filósfera de las plantas (Jones et al., 1991).

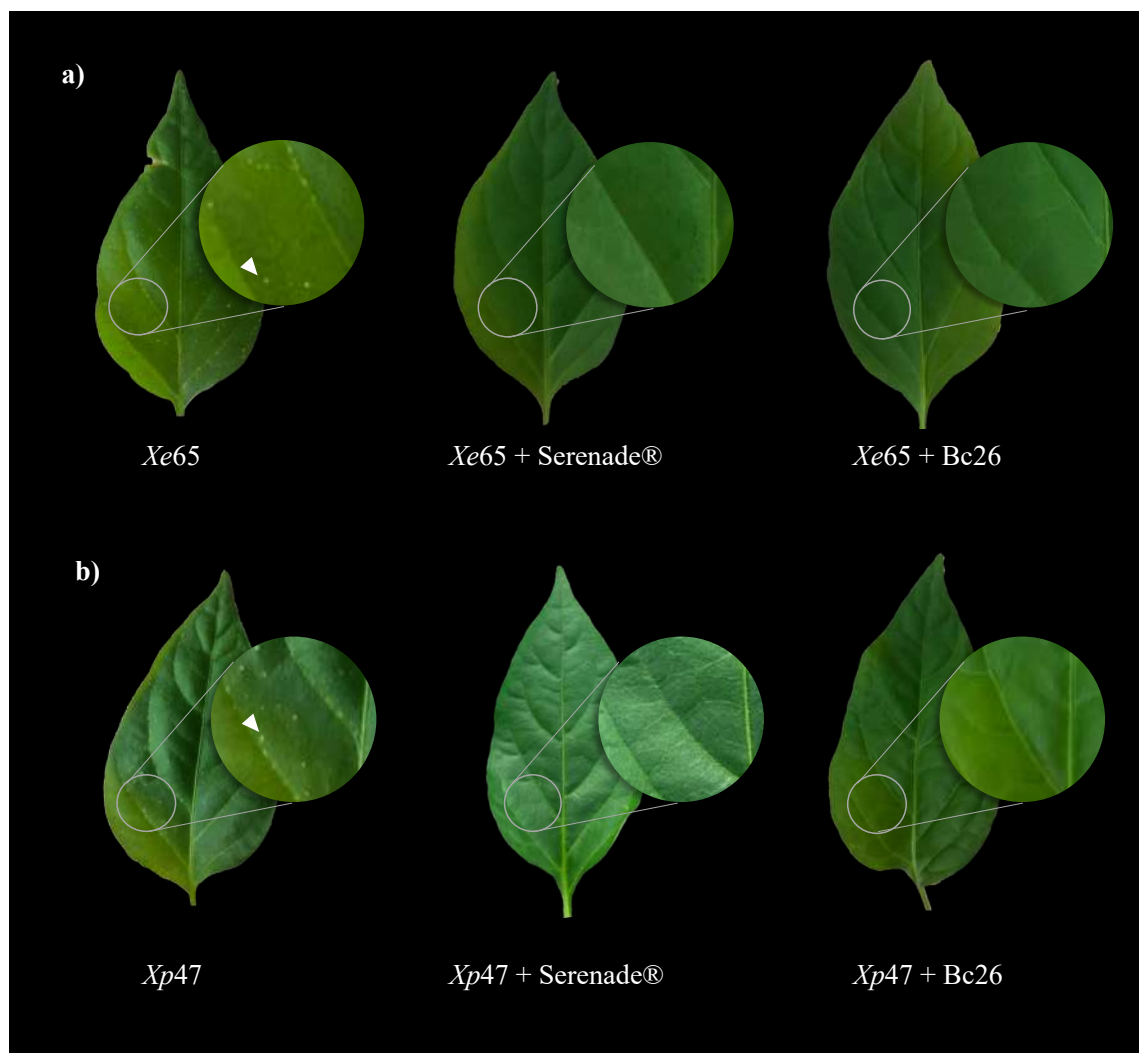


Figura 16. Inhibición de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* y *X. perforans* en plantas de chile por aislamientos de *Bacillus* sp. bajo condiciones controladas. (a) Imágenes representativas de las interacciones entre *X. euvesicatoria* (Xe65) y *Bacillus* spp. (Serenade® y Bc26). (b) Imágenes representativas de las interacciones entre *X. perforans* (Xp47) y *Bacillus* spp. (Serenade® y Bc26). Los triángulos en las fotografías señalan manchas cloróticas en la lámina foliar.

Los resultados obtenidos en este ensayo fueron superiores a lo reportado por otros autores, quienes emplearon de forma asperjada *Bacillus* spp. para el control de *Xanthomonas* spp. en cultivos hortícolas. Por ejemplo, Abdurrahman et al. (2020), reportaron una reducción de solo el 18.2% en la severidad en la mancha bacteriana del

tomate causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, al asperjar una solución de *B. subtilis* K3 sobre el follaje de plántulas de tomate en condiciones de invernadero. Así mismo, Hassan y Zyton (2017) al asperjar *B. subtilis* en plantas de chile sembradas en campo, obtuvieron una reducción de solo el 6.4% de la severidad causada por *X. campestris* pv. *vesicatoria*. De igual manera, Elsis (2017), reporta una reducción del 29.6% de la severidad de *X. campestris* pv. *campestris*, sobre plantas de col establecidas en campo, por medio de la aplicación foliar de *Bacillus* sp. Sin embargo, hay que considerar que los resultados de este ensayo se obtuvieron bajo condiciones controladas, lo cual puede favorecer los mecanismos de biocontrol de *Bacillus* spp. contra las *Xanthomonas*.

El mecanismo principal de biocontrol empleado por *Bacillus* spp. en la fitósfera, se ha atribuido principalmente a la producción de surfactinas, iturinas y fengicinas, las cuales actúan de manera sinérgica como antimicrobianos y permiten la colonización exitosa del antagonista (Legein 2020). Por ejemplo, en *B. subtilis* las surfactinas desencadenan la formación de biopelículas que permite la colonización y el control de la liberación de compuestos antimicrobianos (Wei y Xu 2016). Además, las iturinas y fengicinas alteran la membrana celular de hongos y bacterias, permitiendo su control (Raaijmakers et al. 2010; Cochrane y Vederas 2016). Zerrouh et al. (2011), al realizar aplicaciones foliares *in vitro* de *B. subtilis* en hojas de melón para combatir la mancha bacteriana del melón causada por *X. campestris* pv. *cucurbitae*, logró una inhibición significativa de enfermedad, debido a la producción de iturina.

Por otra parte, es probable que otro de los mecanismos de biocontrol empleado por *Bacillus* spp. que permitiera el control de *X. perforans* y *X. euvesicatoria* en la fitósfera de las plantas de chile en este ensayo, sea la “extinción de quórum” que consiste en la producción de sustancias que degradan las moléculas de señalización de los fitopatógenos, regulando así su virulencia (Ma et al. 2013; Legein 2020). También pudiera considerarse la inducción de la activación de mecanismos de defensa de la planta, ya que se ha reportado que compuestos volátiles emitidos por *Bacillus* en la fitósfera puede activar una respuesta de defensa en las plantas, sin embargo, los receptores aún no se han identificado (Tyagi et al. 2018). Hassan y Zyton (2017), Así mismo, Elsis (2017) indican que la

aspersión de *Bacillus spp.* en plantas de chile y col establecidas en campo, aumentan considerable de la actividad de quitinasa, peroxidasa y polifenol oxidasa, enzimas involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas contra fitopatógenos.

7.12 Biocontrol de la mancha bacteriana en condiciones de invernadero

Las aplicaciones en maceta de los aislamientos de *Bacillus spp.* como inductores de resistencia a la mancha bacteriana, presentaron diferencias ($p < 0.05$) en los resultados del biocontrol de *Xanthomonas euvesicatoria* y *X. perforans* al día 23 de su empleo. En el caso de *X. euvesicatoria*, la inhibición del daño foliar fue de entre 18.1% al 40.0% (Figura 17a). El producto comercial Serenade® mostró los mejores resultados con un promedio de 40.0% de inhibición. Por otro lado, los tratamientos, Bt24, Bc28-5 y Bc26, indujeron inhibiciones similares al producto comercial Fitofort®, el cual inhibió la enfermedad un 37.5%. En contraste, el tratamiento Bc13 indujo la menor inhibición (18.1%), estando 48.2% por de bajo de los dos productos comerciales. La inhibición del daño causado por *X. perforans* fue de entre 8.9 a 40.6% (Figura 17b). El producto comercial Serenade® y el tratamiento Bc26 indujeron la mayor inhibición de la enfermedad con una media de 39.1%. Además, los tratamientos Bt24 y Bc8 indujeron una inhibición media de 35.4%, siendo 45.0% superior al producto Fitofort®, el cual inhibió un 24.4%. Por otra parte, los tratamiento con Bc28-5 y Bc13 indujeron la menor inhibición (9.3%).

Todos los tratamientos con las interacciones entre *X. euvesicatoria* y *X. perforans* con *Bacillus spp.* presentaron síntomas característicos de la mancha bacteriana, pero de forma variada, dependiendo el tratamiento y su inhibición. Los síntomas se caracterizaron por la presencia de manchas necróticas con bordes cloróticos, hojas con áreas con clorosis y/o perforación de la lámina foliar, manchas necróticas con clorosis (Figura 18)

Estos resultados son similares a lo reportado por Mirik et al. (2008) quienes al evaluar el bicontrol de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, en plantas chile bajo condiciones de invernadero, con la aplicación de *Bacillus spp.* al momento de trasplante, obtuvieron una reducción de la enfermedad de entre 11% al 62%. Así mismo, Pajčin et al. (2020) al aplicar *B. velezensis* en plantas de chile para el bicontrol de *X. euvesicatoria* encontraron una supresión significativa de los síntomas de la enfermedad de hasta un 76%. De igual

manera, Chandrasekaran et al. (2017) al emplear *Bacillus subtilis* CBR05 en plantas de tomate encontraron una reducción de la severidad del 54.4% de la mancha bacteriana causada por *X. campestris* pv *vesicatoria*. Además, Yantí et al. (2017), reportaron que al aplicar *B. thuringiensis* en plantas de soya para el control de *X. axonopodis* pv. *glycines* encontraron una reducción de la enfermedad de entre 15.76 a 42.51%.

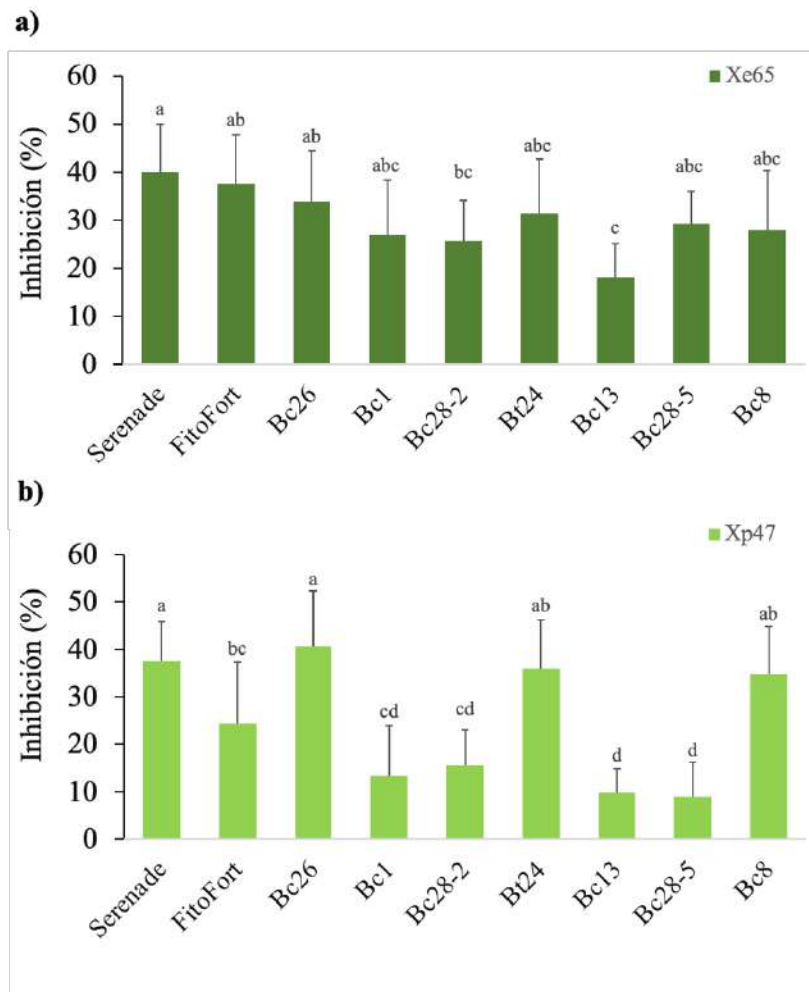


Figura 17. Inhibición de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* (a) y *X. perforans* (b) en plantas de chile por aislamientos de *Bacillus* sp. bajo condiciones de invernadero. Barras con la misma letra no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) Tukey ($n=4$). Serenade®= producto comercial para el control de *Xanthomonas* sp., FitoFort®=producto comercial para inducir de resistencia en enfermedades en hortalizas, Bc= cepas de *Bacillus cereus*, Bt= cepa de *Bacillus thuringiensis*, Xe = cepa de *X. euvesicatoria*, y Xp = cepa de *X. perforans*.

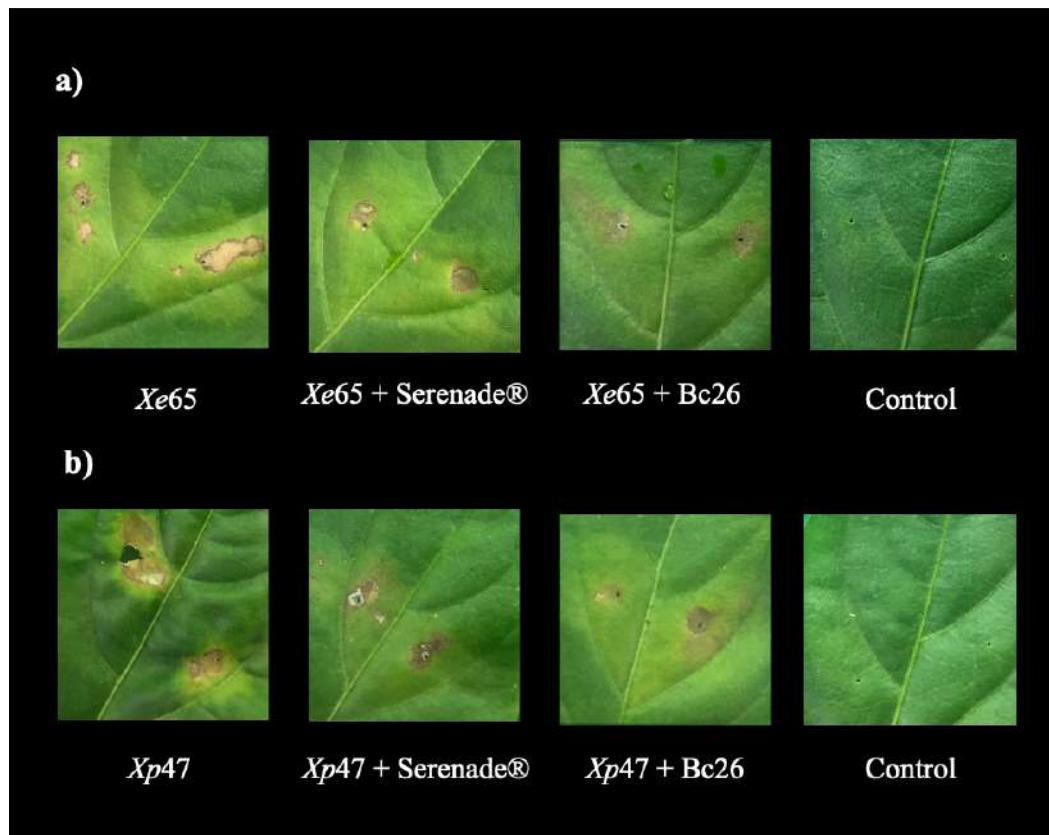


Figura 18. Inhibición de la mancha bacteriana causada por *Xanthomonas euvesicatoria* y *X. perforans* en plantas de chile por aislamientos de *Bacillus* spp. bajo condiciones de invernadero. (a) Imágenes representativas de las interacciones entre *X. euvesicatoria* (Xe65) y *Bacillus* spp. (Serenade® y Bc26). (b) Imágenes representativas de las interacciones entre *X. perforans* (Xp47) y *Bacillus* spp. (Serenade® y Bc26).

La disminución de la severidad de la mancha bacteriana bajo condiciones controladas y de invernadero en las plantas de chile, mediante la aplicaciones de *B. cerus* y *B. thuringiensis* en maceta, se debe a una resistencia inducida en las plantas. La resistencia sistémica inducida (ISR) es un mecanismo donde el antagonista induce una respuesta de defensa en las plantas contra diferentes fitopatógenos, mediante la activación de genes que sintetizan sustancias antimicrobianas, como resultado de la colonización radicular por los microorganismos benéficos (Shine et al. 2018; Tunsagool et al. 2019). La ISR, implica muchas reacciones bioquímicas y síntesis de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PRP) así como cambios estructurales en células y tejidos vegetales (Chen et al. 2020). La ISR es inducida por la producción de compuestos volátiles, síntesis

de algunos péptidos con actividad antimicrobiana y la secreción de moléculas asociadas a los antagonistas (Pedraza et al. 2020).

Estudios indican que *Bacillus* spp. es capaz de inducir una respuesta de defensa sistémica en las plantas y que puede controlar enfermedades causadas por varios fitopatógenos (Shafi et al. 2017). En el caso del control de *Xanthomonas*, se ha reportado su biocontrol indirecto por ISR debido al empleo de *Bacillus* spp. en varios cultivos. Por ejemplo, El-Wakil y Essa (2020) al aplicar *B. subtilis* y *B. thuringiensis* contra *X. campestris* en suelo y semillas de cebada, encontraron una disminución significativa del tizon bacteriano de la cebada. Así mismo, Yang et al. (2009) al aplicar *B. cereus* BS107 a plantas de chile para el control de *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, encontraron una disminución de los síntomas de la enfermedad, debido a la regulación de genes de defensa (*caPR4*, *caPR1* y *caTin1*) presentes en las plantas de chile. De igual manera, Chandrasekaran et al. (2017) reportan un incremento significativo de la actividad de las β -1-3-glucanas y fenilalanina amonioliasas (enzimas relacionadas la ISR) en plántulas de tomate al aplicar *Bacillus subtilis* CBR05, permitiendo el control de *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

El uso de microorganismos para el control de enfermedades en plantas es una alternativa más al empleo de agroquímicos. Algunas bacterias como *B. subtilis*, *B. thuringiensis* y *B. cereus* se han empleado en el control de fitopatógenos (Stoyanova et al. 2014; Legein 2020). Bacterias del género *Bacillus* se emplean comúnmente como productos de biocontrol de fitopatógenos en cultivos hortícolas, aplicándose en el follaje de las plantas (Ongena y Jacques, 2008). Estas bacterias, tienen la capacidad de formar endosporas resistentes facilitan la producción de formulados (Ongena y Jacques 2008).

7.13 Promoción del crecimiento en plántulas de chile jalapeño en condiciones de invernadero por formulados de *Bacillus* sp.

El diámetro de tallo de las plántulas de chile al ser tratadas con los formulados presentaron diferencias ($p < 0.05$), donde solo el tratamiento Bt24 indujo el mayor diámetro de tallo con un promedio de 1.45 cm. En la altura de plántulas, los tratamientos Bc26 y Bt24 indujeron el mayor tamaño de plántulas con un promedio de 9.66 cm, siendo superiores al resto de los tratamientos ($p < 0.05$). Además, el tratamiento Bc8 presentó un tamaño promedio de plántula de 8.62 cm, superior al control y al producto comercial

BactoRaicine ®. Los formulados Bc26 y Bt24 incrementaron un 46.14% la altura de plántulas y Bc8 un 30.4% la altura respecto al control (Tabla 10).

Los tratamientos Bc26 y Bt24 fueron estadísticamente superiores al resto de los tratamientos en el área foliar teniendo un promedio de 22.5 cm² por plántula. Por otra parte, Bc8 y BactoRaicine fueron iguales al control con un promedio de 17.46 cm² de área foliar. El incremento en el área foliar de las plántulas por Bc26 y Bt24 fue de 36.3% al compararlo con el control. En lo que respecta a la longitud de raíz, los formulados no tuvieron un efecto marcado sobre este parámetro, solo el tratamiento Bt24 fue significativamente mejor ($p < 0.05$) que el control con un incremento de 3.71% en el tamaño de raíz.

Tabla 10. Efecto de formulados biológicos de *Bacillus* sp. en parámetros vegetativos de plántulas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento*	Diámetro de tallo (mm)	Altura (cm)	Área foliar (cm ²)	Longitud de raíz (cm)	Peso fresco (g/plántula)			Peso seco (g/plántula)		
					Hoja	Tallo	Raíz	Hoja	Tallo	Raíz
Control (fertilización)	1.25 ^b	6.61 ^c	16.47 ^b	9.16 ^{ab}	0.307 ^b	0.190 ^a	0.143 ^a	0.0232 ^b	0.0098 ^b	0.0095 ^a
BactoRaicine ®	1.24 ^b	7.12 ^c	17.86 ^b	8.09 ^b	0.339 ^b	0.147 ^a	0.150 ^a	0.0258 ^b	0.0109 ^{ab}	0.0070 ^a
Bc26	1.33 ^b	9.80 ^a	22.32 ^a	8.84 ^{ab}	0.424 ^a	0.182 ^a	0.143 ^a	0.0685 ^a	0.0134 ^a	0.0096 ^a
Bc8	1.26 ^b	8.62 ^b	18.04 ^b	8.10 ^b	0.341 ^b	0.133 ^a	0.115 ^a	0.0393 ^{ab}	0.0123 ^{ab}	0.0079 ^a
Bt24	1.45 ^a	9.52 ^a	22.77 ^a	9.50 ^a	0.444 ^a	0.180 ^a	0.166 ^a	0.0356 ^b	0.0137 ^a	0.0101 ^a

Media en una misma columna seguida de la misma letra no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) Tukey (n=4). *Los todos los tratamientos fueron fertilizados cada tercer día durante el ensayo. Control= plantas regadas con solución nutritiva, BactoRaicine®= producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt= *B. turingiensis*, Bc= *B. cereus*.

Con relación a la biomasa fresca de plántulas, los tratamientos no presentaron diferencias ($p < 0.05$) en los pesos frescos de tallo y raíz; obteniendo un peso fresco promedio de 0.19 y 0.143g/ plántula, respectivamente. Pero, en el peso fresco de hoja, los tratamientos Bc26 y Bt24 fueron estadísticamente superiores ($p < 0.05$) al resto de los tratamientos, induciendo un peso fresco promedio de 0.434 g/planta, representando un incremento del 41.36% en este parámetro, respecto al control. Por otro lado, en biomasa seca de plántulas mostró diferencias ($p < 0.05$), en el peso seco de hoja y tallo pero no en el peso seco de raíz, teniendo un promedio de 0.0054 g/planta. El tratamiento Bc26 fue

superior a todos los tratamientos en el peso seco de hoja, con un promedio de 0.0685 g/plántula, representando un incremento del 195.25%. Además, en el peso seco de tallo, los tratamientos Bc26 y Bt24 fueron superiores al resto ($p < 0.05$), con un promedio de 0.0134 g/ plántula, correspondiendo a un 38.2 % de incremento en este parámetro.

El contenido de pigmentos fotosintéticos en las plántulas presentó diferencias ($p < 0.05$) entre tratamientos solo en clorofila a y carotenoides. El control presentó el mayor contenido de clorofila a y carotenoides con un promedio de 1.25 y 0.52 mg/g de peso fresco de hoja, respectivamente. Sin embargo, Bc26 y Bt24 solo tuvieron un 7.2% menos respecto al control, a diferencia de BactoRaicine que tuvo un 12% menos cantidad de estos pigmentos. El contenido promedio de clorofila b en todos tratamientos fue de 0.348 mg/g de peso fresco de hoja (Tabla 11).

El análisis de los principales parámetros vegetativos (diámetro de tallo, altura, longitud de raíz, área foliar y peso seco de hoja, tallo y raíz) mediante un análisis multivariado de componentes principales (ACP), permitió establecer la asociación de los parámetros en dos componentes principales (CP1 y CP2), los cuáles son capaces de explicar el 85.5% de la variabilidad de los datos de la promoción del crecimiento de las plántulas por los formulados bacterianos (Figura 19).

Tabla 11. Efecto de formulados biológicos de *Bacillus* sp. en pigmentos fotosintéticos en plántulas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento *	Pigmentos fotosintéticos (mg/g de peso fresco de hoja)		
	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
Control (fertilización)	1.25 ^a	0.42 ^a	0.52 ^a
BactoRaicine®	1.12 ^b	0.31 ^a	0.49 ^{ab}
Bt24	1.16 ^{ab}	0.35 ^a	0.57 ^{ab}
Bc26	1.15 ^{ab}	0.35 ^a	0.60 ^{ab}
Bc8	1.10 ^b	0.31 ^a	0.64 ^b

Media en una misma columna seguida de la misma letra no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) Tukey (n=4). *Los todos los tratamientos fueron fertilizados cada tercer día durante el ensayo. Control= plantas regadas con solución nutritiva, BactoRaicine®= producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt= *B. turingiensis*, Bc= *B. cereus*.

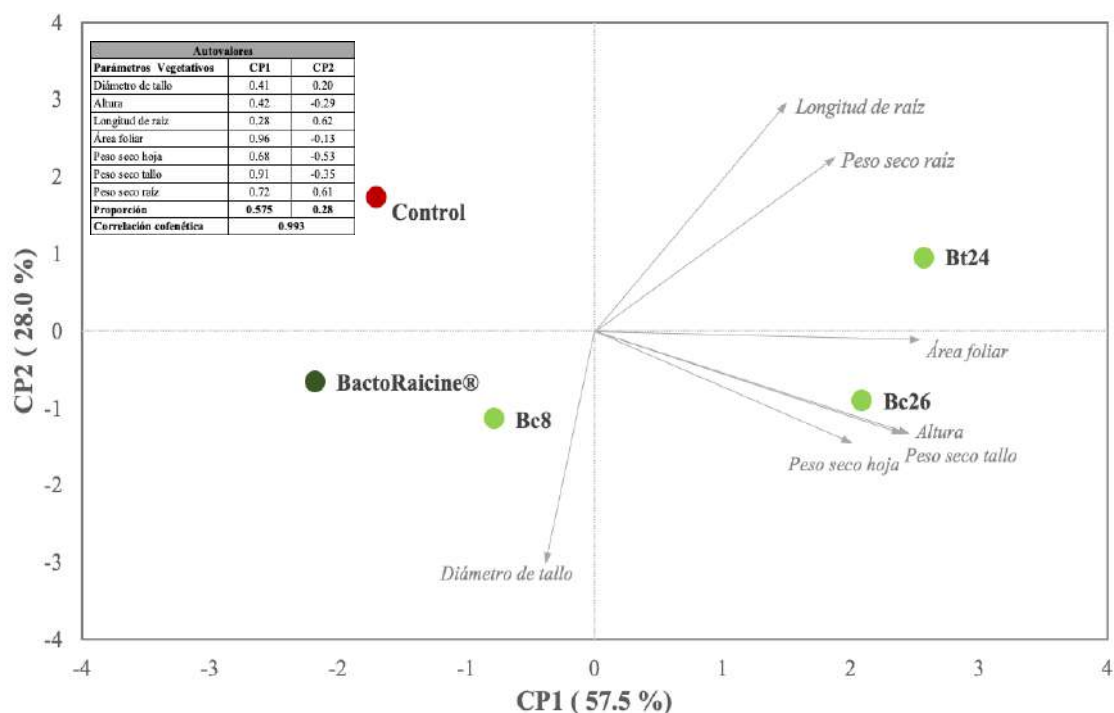


Figura 19. Gráfica de componentes principales (CP1y CP2) de parámetros vegetativos de plántulas de chile inoculadas con formulados a base de *Bacillus* spp. Control= plantas regadas solo con solución nutritiva, BactoRaicine®= producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt24= *B. turingiensis*, Bc26= *B. cereus*, Bc8= *B. cereus*. Las flechas indican la dirección y la magnitud de las correlaciones entre las variables y los componentes obtenidos.

De acuerdo con los resultados, el CP1 está correlacionado de manera positiva con los parámetros de longitud de raíz, peso seco de raíz, área foliar, altura y peso seco de tallo y hoja, representando el 57.5% de la variabilidad de estos parámetros. Por otro lado, el CP2 está correlacionado de manera positiva con longitud de raíz y peso seco de raíz, representando el 28.0% de la variabilidad en estos parámetros. El tratamiento con el formulado Bt24 promovió de manera más exitosa el desarrollo del longitud de raíz, peso seco de raíz, área foliar, altura y peso seco de tallo y hoja. En contraste, el producto comercial Bactoraicine ® resultó muy por debajo de las medias en estos parámetros. Por otra parte, el formulado Bc26 indujo un mejor desarrollo de altura, peso seco de tallo y hoja. En la figura 20 se observa de manera representativa el desarrollo de las plántulas de chile a los 35 días, después de ser tratadas con los formulados bacterianos.



Figura 20. Efecto de formulados biológicos de *Bacillus* sp., en plántulas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero. Control= plantas solo fertilizadas, *BactoRaicine*®= producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt= *B. turingiensis*, Bc= *B. cereus*. Todos los tratamientos con formulados fueron fertilizados.

7.14 Promoción de crecimiento en chile jalapeño en condiciones de invernadero por formulados de *Bacillus* sp.

En la altura de plantas, los tratamientos bacterianos solos y en combinaciones junto con la fertilización fueron iguales estadísticamente e indujeron el mayor tamaño de plantas, con un promedio de 47.13 cm. Los formulados solos o en combinaciones indujeron un incremento en el tamaño de las plantas igual al producto comercial y de 44.28% más que las plantas solo fertilizadas. Se observó un efecto similar de los tratamientos bacterianos sobre el diámetro de tallo. Los formulados solos o en combinaciones indujeron un grosor de tallo de 5.46 cm, igual al producto comercial, representando un 22.97% más que las plantas solo fertilizadas y 35.48% más que el control absoluto (Tabla 12).

Respecto a la longitud de raíz, los tratamientos presentaron diferencias ($p < 0.05$), donde; F+Bc26+Bc8 indujo el mayor tamaño de raíz con 24.6 cm representando un

incremento del 34.20% respecto a las plantas solo con fertilizantes. Además, los tratamientos F+Bc26 y F+Bt24 fueron mejores que el producto comercial con un promedio de 23.40 cm.

El número de hojas en todos los tratamientos bacterianos y las plantas solo con fertilización no presentaron diferencias ($p < 0.05$), teniendo un promedio de 61.21 hojas por planta. En contraste en el área foliar, los tratamientos F+BactoRaicine® y F+Bc26+Bc8 fueron los que indujeron una mayor área foliar, con una media de 817.40 cm², seguido del resto de los tratamientos bacterianos los cuales tuvieron una media de 728.84 cm². El incremento en área foliar por los tratamientos bacterianos fue de 67.49% a 87.84% respecto a las plantas tratadas solo con fertilización.

Tabla 12. Efecto de formulados biológicos de *Bacillus* sp. en parámetros vegetativos de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento *	Altura (cm)	Diámetro de tallo (cm)	Longitud de raíz (cm)	Número de hojas	Área foliar (cm ²)
Control (agua)	22.30 ^c	4.03 ^c	17.50 ^c	21.40 ^b	178.26 ^c
Fertilización (F)	32.67 ^{bc}	4.44 ^{bc}	18.33 ^{bc}	48.00 ^a	435.14 ^{bc}
F+BactoRaicine®	48.80 ^a	5.43 ^a	21.50 ^{abc}	62.80 ^a	796.12 ^a
F+Bt24	47.67 ^a	5.29 ^{ab}	23.50 ^{ab}	62.00 ^a	721.23 ^{ab}
F+Bc26	48.00 ^a	5.61 ^a	23.30 ^{ab}	65.00 ^a	781.29 ^{ab}
F+Bc8	43.00 ^{ab}	5.24 ^{ab}	21.40 ^{abc}	59.20 ^a	722.94 ^{ab}
F+Bt24+Bc26	46.00 ^a	5.14 ^{ab}	22.67 ^{abc}	63.00 ^a	739.23 ^{ab}
F+Bt24+Bc8	45.50 ^a	5.76 ^a	22.00 ^{abc}	62.75 ^a	734.04 ^{ab}
F+Bc26+Bc8	46.40 ^a	5.74 ^a	24.60 ^a	67.00 ^a	838.69 ^a
F+Bc26+Bc8+Bt24	47.60 ^a	5.45 ^a	20.90 ^{abc}	61.20 ^a	674.36 ^{ab}

Media en una misma columna seguida de la misma letra no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) Tukey (n=5). *Los todos los tratamientos fueron fertilizados cada tercer día durante el ensayo. Control= plantas solo regadas con agua, Fertilización= plantas solo fertilizadas, BactoRaicine®= producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt= *B. turingiensis*, Bc= *B. cereus*.

Con relación a la biomasa fresca de planta, los tratamientos bacterianos indujeron un mayor peso fresco de hoja, tallo y raíz respecto a las plantas solo fertilizadas y al control absoluto. Las combinaciones de los formulados de Bc8 con Bc26 y Bt24 fueron estadísticamente superiores al resto de los tratamientos en los tres parámetros de biomasa fresca. Además, Bc26 se comportó igual que el producto comercial en peso fresco de hoja

y tallo. Por otro lado, las plantas de control absoluto presentaron la menor biomasa fresca, seguidas de las plantas tratadas solo con fertilizantes (Tabla 13). Al comparar la biomasa fresca del control con los mejores tratamientos (F+Bt24+Bc8 y F+Bc26+Bc8), el incremento en el peso fresco de hoja, tallo y raíz fue de 110.0%, 114.26% y 216%, respectivamente.

De igual manera, los tratamientos bacterianos indujeron un mayor peso seco de hoja, tallo y raíz respecto a las plantas solo fertilizadas y al control absoluto. Así mismo, las combinaciones de los formulados de Bc8 con Bc26 y Bt24 fueron superiores ($p < 0.05$) al resto de los tratamientos en los tres parámetros de biomasa seca. El incremento de la biomasa seca en hoja, tallo y raíz fue de 82.38%, 81.20% y 191.66%, respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto de formulados biológicos de *Bacillus* sp. en biomasa de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.

Tratamientos*	Peso fresco (g/planta)			Peso seco (g/planta)		
	Hoja	Tallo	Raíz	Hoja	Tallo	Raíz
Control (agua)	4.95 ^c	4.03 ^c	2.68 ^c	0.77 ^c	0.85 ^c	0.28 ^c
Fertilización (F)	10.50 ^{bc}	10.43 ^{bc}	4.67 ^{bc}	1.93 ^{bc}	2.16 ^{bc}	0.44 ^{bc}
F+BactoRaicine®	21.58 ^a	22.54 ^a	9.94 ^{abc}	3.31 ^{ab}	4.07 ^a	1.04 ^{ab}
F+Bt24	20.43 ^{ab}	20.57 ^{ab}	9.40 ^{abc}	2.58 ^{ab}	3.88 ^a	0.84 ^{abc}
F+Bc26	23.06 ^a	22.80 ^a	12.06 ^{ab}	3.30 ^{ab}	3.90 ^a	1.22 ^a
F+Bc8	17.82 ^{ab}	18.60 ^{ab}	10.00 ^{abc}	2.85 ^{ab}	3.29 ^{ab}	0.78 ^{abc}
F+Bt24+Bc26	19.53 ^{ab}	19.73 ^{ab}	11.17 ^{ab}	3.09 ^{ab}	2.75 ^{ab}	1.03 ^{ab}
F+ Bt24+Bc8	20.90 ^a	21.93 ^a	13.10 ^a	3.37 ^{ab}	3.88 ^a	1.19 ^a
F+Bc26+Bc8	22.68 ^a	22.12 ^a	16.44 ^a	3.52 ^a	3.84 ^a	1.44 ^a
F+Bc26+Bc8+Bt24	18.48 ^{ab}	20.74 ^{ab}	11.62 ^{ab}	3.02 ^{ab}	3.57 ^{ab}	0.97 ^{abc}

Media en una misma columna seguida de la misma letra no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) Tukey (n=5). *Los todos los tratamientos fueron fertilizados cada tercer día durante el ensayo. Control= plantas solo regadas con agua, Fertilización= plantas solo fertilizadas, BactoRaicine®= producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt= *B. turingiensis*, Bc= *B. cereus*.

Al analizar la influencia de los tratamientos durante la floración y frutificación, se observó que los formulados Bc26 y Bt24 solos, combinados entre ellos y con Bc8 indujeron un mayor desarrollo de botones florales. Estos tratamientos tuvieron una media de 29.35 botones por planta, lo cual representa un incremento del 100% en este parámetro.

Por otro lado, los otros tratamientos bacterianos indujeron el mismo número de botones florales que el producto comercial y las plantas solo fertilizadas. En cuanto a las flores abiertas, no se presentó una diferencia estadística significativa, teniendo un promedio de 4.24 flores por planta al momento de la evaluación. Por otra parte, en cuanto al número de frutos por planta, el formulado Bt24 indujo un mayor amarre de frutos con 8.0 frutos por planta (Tabla 14).

Tabla 14. Efecto de formulados biológicos de *Bacillus* sp. en floración y fructificación de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento *	Botones florales/planta	Flores abiertas/planta	Botones+flores/planta	Frutos/ planta
Control (agua)	5.75 ^b	4.00 ^a	6.75 ^b	---
Fertilización (F)	14.67 ^{ab}	2.00 ^a	16.00 ^{ab}	3.00 ^{ab}
F+BactoRaicine®	22.60 ^{ab}	4.40 ^a	27.00 ^{ab}	3.00 ^{ab}
F+Bt24	32.00 ^a	3.00 ^a	33.00 ^a	8.00 ^a
F+Bc26	29.40 ^a	5.80 ^a	35.20 ^a	3.00 ^{ab}
F+Bc8	22.40 ^{ab}	4.40 ^a	26.80 ^{ab}	4.50 ^{ab}
F+ Bt24+Bc26	27.33 ^a	5.33 ^a	32.67 ^a	5.67 ^{ab}
F+Bt24+Bc8	27.25 ^a	4.00 ^a	31.25 ^a	1.00 ^b
F+Bc26+Bc8	30.80 ^a	5.50 ^a	35.20 ^a	2.75 ^{ab}
F+Bc26+Bc8+Bt24	23.80 ^{ab}	4.00 ^a	27.80 ^{ab}	4.33 ^{ab}

Media en una misma columna seguida de la misma letra no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) Tukey ($n=5$). *Los todos los tratamientos fueron fertilizados cada tercer día durante el ensayo. Control= plantas solo regadas con agua, Fertilización= plantas solo fertilizadas, BactoRaicine®= producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt= *B. turingiensis*, Bc= *B. cereus*.

El contenido de pigmentos fotosintéticos en las plantas presentó diferencias ($p < 0.05$) entre tratamientos solo en clorofila a y carotenoides. Las plantas tratadas con el formulado Bc8 solo, en combinación con Bc26 y Bt24, indujeron una mayor cantidad de clorofila a con un promedio de 1.26 mg/g de peso fresco de hoja, representando un 21.15% más pigmento, en comparación a las plantas solo fertilizadas. Cabe mencionar que el producto comercial tuvo la menor cantidad de clorofila a, con tan solo 0.91 mg/g de peso fresco de hoja. En cuanto al contenido de clorofila b en todos tratamientos no hubo diferencias ($p < 0.05$), teniendo un promedio de 0.58 mg/g de peso fresco de hoja. Por otro lado, en la cantidad de carotenoides el formulado Bc8 solo indujo la mayor cantidad, con 0.64 mg/g de peso fresco de hoja. En contraste, el producto comercial BactoRaicine®,

indujo una menor cantidad de carotenoides, con tan solo 0.49 mg/g de peso fresco de hoja (Tabla 15).

Tabla 15. Efecto de formulados biológicos de *Bacillus* sp. en pigmentos fotosintéticos de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero.

Tratamientos*	Pigmentos fotosintéticos (mg/g de peso fresco de hoja)		
	Clorofila a	Clorofila b	Carotenoides
Control	0.92 ^{bc}	0.33 ^a	0.52 ^{ab}
Fertilización	1.04 ^{abc}	0.50 ^a	0.62 ^{ab}
BactoRaicine®	0.91 ^c	0.31 ^a	0.49 ^b
Bt24	0.99 ^{abc}	0.45 ^a	0.57 ^{ab}
Bc26	1.20 ^{abc}	0.65 ^a	0.60 ^{ab}
Bc8	1.27 ^a	0.82 ^a	0.64 ^a
Bt24+Bc26	1.23 ^{ab}	0.60 ^a	0.62 ^{ab}
Bt24+Bc8	1.26 ^a	0.88 ^a	0.63 ^{ab}
Bc26+Bc8	1.29 ^a	0.79 ^a	0.63 ^{ab}
Bc26+Bc8+Bt24	1.25 ^a	0.54 ^a	0.63 ^{ab}

Media en una misma columna seguida de la misma letra no fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Tukey (n=5). *Los todos los tratamientos fueron fertilizados cada tercer día durante el ensayo. Control = plantas solo regadas con agua, Fertilización= plantas solo fertilizadas, BactoRaicine® = producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt = *B. turingiensis*, Bc = *B. cereus*.

El análisis de los principales parámetros vegetativos (número de frutos, número de botones + frutos, diámetro de tallo, altura, longitud de raíz, área foliar y peso seco de hoja, tallo y raíz) mediante un análisis multivariado de componentes principales (ACP), permitió establecer la asociación de los parámetros en dos componentes principales (CP1 y CP2), los cuáles son capaces de explicar el 92.0% de la variabilidad de los datos de la promoción del crecimiento de las plantas por los formulados bacterianos (Figura 21).

De acuerdo con los resultados, el CP1 está correlacionado de manera positiva con los parámetros de número de botones + frutos, diámetro de tallo, altura, longitud de raíz, área foliar y peso seco de hoja, tallo y raíz, representando el 76.9% de la variabilidad de estos parámetros. Por otro lado, el CP2 está correlacionado de manera positiva con el número de frutos, representando el 15.0% de la variabilidad en este parámetro. El tratamiento con la combinación de los formulado Bc26 + Bc8 promovió de manera más exitosa el desarrollo de las plantas de chile y sobre todo en el desarrollo de botones florales

y flores abiertas. Además, los tratamientos Bc24+B8 y Bc26 también presentaron influencias positivas en el desarrollo de las plantas, por arriba del producto comercial. En la figura 21 se observa de manera representativa el desarrollo de las plantas de chile a los 35 días, después de ser tratadas con los formulados bacterianos (Figura 22).

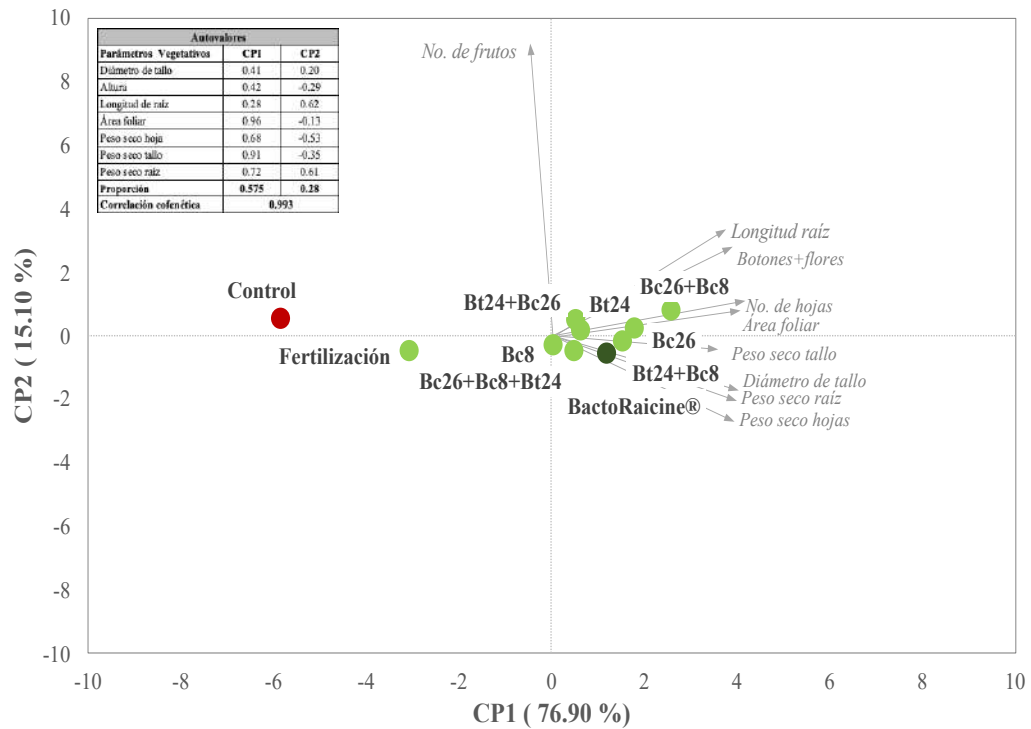


Figura 21. Gráfica de componentes principales (CP1 y CP2) de parámetros vegetativos de plantas de chile inoculadas con formulados a base de *Bacillus* spp. Control= plantas regadas solo con solución nutritiva, Fertilización= plantas fertilizadas con solución nutritiva, BactoRaicine®= producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt24= *B. turingiensis*, Bc26= *B. cereus*, Bc8= *B. cereus*. Las flechas indican la dirección y la magnitud de las correlaciones entre las variables y los componentes obtenidos.



Figura 22. Efecto de formulados biológicos de *Bacillus* sp., en plantas de chile jalapeño bajo condiciones de invernadero. Control= plantas fertilizadas, *BactoRaicine*®= producto comercial promotor de crecimiento a base de *Bacillus subtilis*, Bt= *B. turingiensis*, Bc= *B. cereus*. Todos los tratamientos con formulados fueron fertilizados.

Los resultados de la promoción del crecimiento en plántulas y plantas de chile en condiciones de invernadero, por los formulados de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, son similares o superiores a lo reportado por varios autores, quienes obtuvieron mejoras significativas en uno o varios parámetros vegetativos de cultivos hortícolas al emplear *Bacillus* spp.

En el caso de la altura de planta, en nuestro estudio se logró un incremento del 44.3% en plantas tratadas con los formulados, bajo condiciones de invernadero, siendo superior a lo reportado previamente por Mirik et al. (2008), Datta et al. (2015) y Samaniego et al. (2016), quienes obtuvieron incrementos en la altura en plantas de chile de entre 22 y 33% con el empleo de *Bacillus* spp. Así también, Hernández et al. (2018) quienes al aplicar *B. amyloliquefasciens* en plantas de chile chiltepín en campo, encontraron un incremento del 27.9% en la altura de las plántas. Además, Chandrasekaran et al. (2017) encontraron un aumento del 17.8% en la altura de plantas de tomate al ser tratadas con *Bacillus subtilis* CBR05 bajo condiciones controladas.

Respecto al diámetro de tallo, en este estudio se logró un incremento de entre 16 a 22.9% siendo similar a lo reportado previamente por Samaniego et al., 2016 y Hernández et al., 2018, quienes obtuvieron un incremento en el grosor de tallo en chile de entre 9.4 a 34% al tratarlas con *Bacillus* spp. Con respecto al área foliar, en plántulas los resultados encontrados en este estudio fueron similares a lo reportado por Datta et al. (2015), quienes obtuvieron un 35.97% de incremento en el área foliar de chile con la aplicación de *Bacillus* sp. bajo condiciones de invernadero. En contraste, los resultados entre plantas jóvenes del área foliar fue de entre 67.49 a 87.64%, siendo superior a lo reportado por Datta et al. (2015) y Hernández et al. (2018).

En cuanto a la longitud de raíz, el incremento en este estudio fue de 34.20% siendo superior a lo reportado por Park et al. (2010) y Son et al. (2014), quienes obtuvieron incrementos de 27.31 y 18.79%, respectivamente. Sin embargo, Guenoun et al. (2018), un incremento en la longitud de raíz de hasta 88.79%.

Los parámetros de peso fresco de tallo y raíz, obtenidos en este estudio fueron superiores a lo reportados previamente por Hernández et al. (2018) quienes al aplicar *Bacillus* spp. en plantas de chile encontraron incrementos de biomasa fresca de 67.1 y 69.8%, respectivamente. En contraste, el peso fresco de hoja fue menor a lo reportado por

Guenoun et al. (2018), quienes obtuvieron un incremento de hasta 176%, en este parámetro. Por otra parte, en la biomada seca de tallo y raíz los resultados fueron similares a lo reportado por Park et al. (2010), Hernández et al. (2018), y Guenoun et al. (2018), quienes reportan un incremento de biomasa seca de tallo de entre 50 a 470% y para peso seco de raíz de entre 119.4 a 437%. En contraste, el peso seco de hoja fue menor a lo reportado por Guenoun et al. (2018), quienes reportan un incremento de 146.6% en peso seco de hoja.

El contenido de pigmentos fotosintéticos mejoró con los tratamientos bacterianos, pero solo en clorofila a y carotenoides. El aumento en el contenido de clorofila a, coincide con lo reportado por Seon et al. (2014), quienes reportan un incremento de clorofila a de 27.78% en plantas de chile iconuladas con *Bacillus* sp. De acuerdo, Park et al. (2010) el aumento del contenido de clorofila a puede inducir el crecimiento vegetal de plantas de chile, sugiriendo que esto puede deberse a cambios en el metabolismo de la planta.

Respecto al contenido de clorofila b, los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Cisternas et al. (2019) quienes no encontraron incrementos en este pigmento en plántulas de chile en etapa de almácigo inoculadas *B. amyloliquefaciens*. En contraste, Seon et al. (2014), reportaron un incremento de 29.6% en clorofila b en plantas de chile tratadas con *Bacillus* sp. Finalmente, el incremento en el contenido de carotenoides se ha reportado en otros cultivos debido a la inoculación de *Bacillus* sp., como lo reporta Alamri et al. (2019) quienes encontraron un incremento de estos pigmentos de hasta 63.63% en plantas de lechuga cultivadas bajo condiciones de invernadero e inoculadas con *Bacillus subtilis*.

La inducción a una mayor floración y una mejor producción por parte de *Bacillus* spp. se ha reportado anteriormente en otros cultivos. Por ejemplo, Yantí et al. (2017) al emplear formulados de *B. turingiensis* en soya, encontraron una aceleración en el desarrollo de la floración y aumentaron el rendimiento del cultivo.

Estudios demuestran que la aplicación de PGPR aumenta el crecimiento en plantas de chile Yanti y Nasution 2017). Se sabe que el género *Bacillus*, induce un mayor crecimiento en diversos cultivos mediante la producción de reguladores de crecimiento, solubilización de fósforo, producción de sideróforos así como su colonización exitosa de la rizósfera. Los resultados de este estudio sobre el desarrollo del cultivo de chile en

invernadero con la aplicación de los formulados a base de *B. thuringiensis* y *B. cereus*, confirman que estas bacterias son capaces de promover el crecimiento vegetal en este cultivo, debido probablemente a los siguientes mecanismos, en el caso de *B. thuringiensis* y *B. cereus* se ha reportado que su capacidad de promover el crecimiento vegetal en cultivos como repollo, lechuga, chícharo, soya, chile, etc. se debe a que pueden colonizar la rizosfera de las plantas al aplicarlo al sustrato (Praca et al. 2012; Chinakwe et al. 2019), así como a la producción de AIA (Gomes et al. 2003; Mishara et al. 2009) y la solubilización de fósforo del suelo (Cherif-Silini et al. 2016; Jouzani et al. 2017). Cabe mencionar que se ha encontrado que *B. thuringiensis* y *B. cereus*, tienen genes homologos que producen fosfatasas que le permiten la solubilización de fósforo (Raddadi et al. 2008; Yanti y Nasution 2017). Además, *B. thuringiensis* y *B. cereus*, tienen la capacidad de producir sideróforos que permiten atrapar fierro que la planta puede aprovechar para su crecimiento y controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos debido a la competencia por el fierro (Chaabouni et al. 2012; Azizoglu 2019, Chinakwe et al. 2019)

VIII. CONCLUSIONES

1. El monitoreo en campo de la mancha bacteriana del chile en la zona centro sur del estado de Chihuahua, indica que las variedades de chile Leopardo y Rivera son las más afectadas por enfermedad.
2. Las variedades menos afectadas por la mancha bacteriana son Ball park, Page e Imperial, las cuales pudieran recomendarse de forma comercial y así reducir las pérdidas del rendimiento del cultivo, debido a esta enfermedad.
3. *Xanthomonas perforans* podría considerarse como un patógeno emergente del chile en México, ya que los aislamientos que resultaron en la mayor severidad de manchas bacterianas contra las plantas de chile jalapeño.
4. La aplicación de aislamientos de *B. cereus* y *B. thuringiensis* de forma directa al follaje en plantas de chile jalapeño, ayudó de manera significativa en el control de la mancha bacteriana causada por *X. perforans*. Así mismo, los aislamientos de *Bacillus* inhibieron el crecimiento de todas las cepas patógenas de *Xanthomonas* confrontadas en el ensayo *in vitro*, indicando su potencial como agente de biocontrol.
5. El empleo de formulados a base de *B. cereus* y *B. thuringiensis* para la promoción del crecimiento de plantas de chile en invernadero mostró resultados favorables en varios parámetros vegetativos, lo que permitiría su empleo en un futuro como parte del manejo integrado del cultivo de chile.

IX. PERSPECTIVAS

El monitoreo en campo de la mancha bacteriana del chile en la zona centro sur del estado de Chihuahua, indica que *X. perforans* podría considerarse como un patógeno emergente del chile en la zona, por lo que se debería estudiar su presencia en otros cultivos de la zona, así como los mecanismos de transmisión, que permitan contribuir a un mejor control de la enfermedad.

El efecto de *Bacillus* sobre el crecimiento de *Xanthomonas in vitro* evidenció el potencial con biocontrol de esta bacteria; sin embargo, sería importante determinar las sustancias antimicrobianas generadas por *Bacillus*.

La presencia de resistencia al cobre por *Xanthomonas* en la región evidencia el proceso de adaptación del patógeno a los compuestos empleados para su control, por lo que se debería evaluar nuevas estrategias de manejo de la enfermedad.

En este estudio se demostró que *B. cereus* y *B. thuringiensis* pueden controlar a *X. perforans* y *X. euvasicatoria* en chile, siendo importante elucidar los mecanismos de acción empleados por el antagonista en el control directo sobre el follaje.

Bacillus cereus y *B. thuringiensis* promovieron el crecimiento de plantas de chile en invernadero; sin embargo, sería importante evaluar en un futuro su efecto en la producción y calidad del cultivo, lo que permitiría su empleo parte del manejo del cultivo de chile.

Entre las estrategias de manejo de manchas bacterianas, en México se deben evaluar opciones a los compuestos a base de cobre en la región de Chihuahua ya que se los aislamientos de *Xanthomonas*, resultaron resistentes al cobre.

El uso de combinaciones y dosis adecuadas de antibióticos podría ser eficaz para el control de bacterias fitopatógenas como *Xanthomonas*, reduciendo la resistencia bacteriana y produciendo un bajo impacto en el medio ambiente.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi PA, Khabbaz SE, Weselowski B, Zhang L. 2015. Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario. Canadian Journal of Microbiology 61:753-761. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0228>
- Abdurrahman FF, Ahamed KM, Amein TA. 2020. Comparison among Various Control Methods of Tomato Bacterial Spot Disease (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*). Rafidain journal of science 29(1E),20-28. <http://dx.doi.org/10.33899/rjs.2020.164471>
- Agrios G. 2005. *Fitopatología*. Limusa:México, pp. 401.
- Aguilar-Rincón VH. 2012. Cultivo del chile en México. Revista fitotecnia mexicana, 35: 264-264.
- Aguilar C, Zúñiga A, Guzmán A, Garruña R. 2017. PGPR inoculation improves growth, nutrient uptake and physiological parameters of *Capsicum chinense* plants. International Journal of Experimental Botany 86:199-204.
- Alamri S, Hashema M, Mostafa Y, Nafady N, Abo-Elyousr K. 2019. Biological control of root rot in lettuce caused by *Exserohilum rostratum* and *Fusarium oxysporum* via induction of the defense mechanism. Biological Control 128:76-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.09.014>
- An SQ, Potnis N, Dow M, Vorhölter FJ, He YQ, Becker A, Tang J L. 2019. Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen *Xanthomonas*. Federation of Eupopian Microbiology Society Microbiology Reviews. 44:1-32. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz024>
- Areas MS, Goncalves RM, Soman JM, Souza-Filho RC, Gioria R, Junior S. 2018. Resistance of *Xanthomonas euvesicatoria* strains from Brazilian pepper to copper and zinc sulfates. Anais da Academia Brasileira de Ciências 90:2375-2380. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160413>
- Astorga-Quirós K, Meneses-Montero K, Zúñiga-Vega C, Brenes-Madriz JA, Rivera-Méndez W. 2014. Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. Revista Tecnología en Marcha 27:82.
- Azizoglu U. 2019. *Bacillus thuringiensis* as a biofertilizer and biostimulator: a mini-review of the little-known plant growth-promoting properties of Bt. Current microbiology 1-7. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01705-9>
- Barak JD, Vancheva T, Lefeuvre P, Jones JB, Timilsina S, Minsavage GV, Vallad GE, Koebnik R. 2016. Whole-genome sequences of *Xanthomonas euvesicatoria* strains clarify taxonomy and reveal a stepwise erosion of type 3 effectors. Frontiers in plant science 7:1805. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01805>
- Bardacki F, Skibinski DOF. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. Heredity 73:117-123. <https://www.nature.com/articles/hdy1994110.pdf?origin=ppub>

- Bardakci F, Skibinski DOF. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73:117-123. <https://www.nature.com/articles/hdy1994110.pdf?origin=ppub>
- Behlau F, Hong JC, Jones JB, Graham JH. 2013. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated *Xanthomonas*. *Phytopathology* 103:409-418. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-06-12-0134-R>
- Behlau F, Gochez AM, Jones JB. 2020. Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. *Tropical Plant Pathology* 45:200–212. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00340-1>
- Brown NL, Rouch DA, Lee BT. 1992. Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 27:41-51. [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(92\)90005-U](https://doi.org/10.1016/0147-619X(92)90005-U)
- Calvo P, Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada* 9:31-39.
- Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende-Molar R, Márquez-Zequera I, Millán-Ocampo S, Gaxiola-Espinoza G. 2001. Sensibilidad a cobre de cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:72-77. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219110>
- Carvalho R, Duman K, Jones JB, Paret ML. 2019. Bactericidal activity of copper zinc hybrid nanoparticles on copper tolerant *Xanthomonas perforans*. *Scientific Reports* 9:1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56419-6>
- Castellón-Martínez É, Chávez-Servia JL, Carrillo-Rodríguez JC, Vera-Guzman AM. 2012. Preferencias de consumo de chiles (*Capsicum annuum* L.) nativos en los valles centrales de Oaxaca, México. *Revista fitotecnia mexicana* 35:27-35.
- Chaabouni I, Guesmi A, Cherif A. 2012. Secondary metabolites of *Bacillus*: potentials in biotechnology. En: Sansinenea E (ed) *Bacillus thuringiensis* biotechnology chapter 18. Springer, Dordrecht, pp 347–366. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3021-2_18
- Chandrasekaran M, Belachew ST, Yoon E, Chun SC. 2017. Expression of β -1, 3-glucanase (GLU) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) genes and their enzymes in tomato plants induced after treatment with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of general plant pathology* 83:7-13.
- Chávez-Dozal A, Morales-Morales HA, Sanogo S, Segovia-Lerma A, Smith GB. 2012. Antibacterial activity of mexican oregano essential oil (*Lippia berlandieri*) against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas euvesicatoria*. *Medio Ambiente y Desarrollo sustentable* 8:109-121. Accesado el 28-enero-2021. <https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/620/643>
- Chen K, Tian Z, He H, Long CA, Jiang F. 2020. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. *Biological Control* 151:104419. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104419>

- Cherif-Silini H, Silini A, Yahiaoui B, Ouzari I, Boudabous A. 2016. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. *Annals of Microbiology* 66:1087–1097. <https://doi.org/10.1007/s13213-016-1194-6>
- Chien YC, Huang CH. 2020. Biocontrol of bacterial spot on tomato by foliar spray and growth medium application of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma asperellum*. *European Journal of Plant Pathology* 156:995–1003. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01947-5>
- Chinakwe EC, Nwogwugwu NU, Ibekwe VI, Chinakwe PO, Egbadon EO, Adeleye SA. 2019. Isolation and evaluation of bacteria exhibiting multiple plant growth traits in the rhizosphere of yellow bell pepper (*Capsicum chinense*). *Journal of Advances in Microbiology* 14:1-6. <https://doi.org/10.9734/jamb/2019/v14i430070>
- Cisternas JR, Salvatierra A, Vega E, Uribe M, Gabriela G, A. Stoll. 2019. Root inoculation of green bell pepper (*Capsicum annum*) with *Bacillus amyloliquefaciens* BCC047: Effect on biochemical composition and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 37:588-593 <https://doi.org/10.1002/jsfa.9758>
- Cochrane SA, Vederas JC. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews* 36:4–31. <https://doi.org/10.1002/med.21321>
- Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, VanMalderghem C, De Vos P, Cottyn B. 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology* 65:792-806. <https://doi.org/10.1111/ppa.12461>
- Cooksey DA. 1994. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 14:381-386. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00112.x>
- Datta M, Paul D, Narayan S, Sengupta C. 2015. Plant growth promoting rhizobacteria improve the production and enhancement of alkaloid content in chilli. *Frontiers in Environmental Microbiology* 1:24-26. <https://doi.org/10.11648/j.fem.20150102.13>
- de Aguiar LA, Kimura O, Castilho AMC, Castilho KSC, Ribeiro R, Akiba F, do Carmo MGF. 2003. Effect of copper formulations on resident *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* populations on sweet pepper leaf surfaces. *Horticultura Brasileira* 21:44-50. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-05362003000100009>
- Díaz NA, Ruiz JAB, Reyes EF, Cejudo AG, Novo JJ, Peinado JP, Fiñana IT. 2000. Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. 8 (d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net) Accesado el 28-enero-2021.
- Dickinson DN, La Duc MT, Satomi M, Winefordner JD, Powell DH, Venkateswaran K. 2004. MALDITOFMS compared with other polyphasic taxonomy approaches for the identification and classification of *Bacillus pumilus* spores. *Journal Microbiology Methods* 58:1-12. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.02.011>

- El-Wakil DA, Essa AM. 2020. Antagonistic potential of some bacterial strains against *Xanthomonas campestris*, the cause of bacterial blight in *Hordeum vulgare*. *BioResources* 15:4205-4216.
- Elsisi A. 2017. Role of Antibiosis in Control of Cabbage Black Rot Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Egyptian Journal of Phytopathology* 45: 165-181. <https://dx.doi.org/10.21608/ejp.2017.88598>
- Escalona AMA. 2002. Interacción de plantas de café fertilizadas con fósforo e inoculadas con hongos micorrizicos arbusculares y *Phoma costarricensis* Echandi. Tesis de maestría. Universidad de Colima. Colima, México. 106 p.
- EPPO - European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2013. PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*), causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *EPPO Bulletin* 43:7–20. <https://doi.org/10.1111/epp.12018>
- Farfán LM, Benítez SV, Carvajal LMH. 2014. Sensibilidad de bacterias procedentes de pasifloras a antibióticos y productos cúpricos. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 8:20-33. <https://doi.org/10.17584/rcch.2014v8i1.2797>
- Fayette J, Roberts PD, Pernezny KL, Jones JB. 2012. The role of cymoxanil and famoxadone in the management of bacterial spot on tomato and pepper and bacterial leaf spot on lettuce. *Crop Protection* 31:107-112. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.09.006>
- Gomes AMA, Mariano RLR, Silveira EB, Mesquita JCP. 2003. Isolamento, seleção de bactérias e efeito de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. *Horticultura Brasileira* 21:701–705. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000400026>
- González-Franco AC, Gill-Langarica EM, Robles-Hernández L, Núñez-Barrios A, Pérez-Leal R, Hernández-Rodríguez OA, Pérez-Moreno L. 2014. Detección de virus que afectan al cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua, México. *Revista mexicana de fitopatología* 32:38-51.
- Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture* 2: 1127500. <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>
- Grady EN, MacDonald J, Ho MT, Weselowski B, McDowell T, Solomon O, Yuan ZC. 2019. Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC microbiology* 19:1-14. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
- Griffin K, Gambley C, Brown P, Li Y. 2017. Copper tolerance in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review. *Crop Protection* 96:144-150. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.02.008>

- Guenoun K, Chattaoui M, Bouri M, Rhouma A, Naghmouchi K, Raies A. 2019. Biological control of growth promoting rhizobacteria against verticillium wilt of pepper plant. *Biologia* 74:237-250. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-00169-9>
- Hamley IW. 2015). Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chemical Communications* 51:74–83.
- Hamza A, Robene-Soustrade I, Jouen E, Gagnevin L, Lefeuvre P, Chiroleu F, Pruvost O. 2010. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant Disease* 94:993-999. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-0993>
- Harman GE. 2011. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist* 189:647-649. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03614.x>
- Hassan EO, Zyton MA. 2017. Management of Bacterial Spot of Pepper Caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *American Journal of Bioscience and Bioengineering* 5:41-49.
- Hernández JLG, Alvarado MCR, Rangel PP, Nieto-Garibay A, Murillo-Amador B, Ruiz-Espinoza FH, Puente EOR. 2018. Growth and oil yield parameters of the *Capsicum annuum* var *aviculare* associated to the beneficial bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* and *Azospirillum halopraeferens* under field conditions. *Biotechnia* 20:59-64.
- Hert AP, Marutani M, Momol MT, Roberts PD, Olson SM, Jones JB. 2009. Suppression of the Bacterial Spot Pathogen *Xanthomonas euvesicatoria* on tomato leaves by an attenuated autant of *Xanthomonas perforans*. *Applied and Environmental Microbiology* 75:3323-3330. <https://doi.org/10.1128/AEM.02399-08>
- Ignjatov M, Gašić K, Ivanović M, Šević M, Obradović A, Milošević M. 2010. Characterization of *Xanthomonas euvesicatoria* strains pathogens of pepper in Serbia. *Pesticidi i fitomedicina* 25:139-149.
- Ji SH, Gururani MA, Chun SC. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research* 169:83-98. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.00>
- Jiang CH, Liao MJ, Wang HK, Zheng MZ, Xu JJ, Guo JH. 2018. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 126: 147-157. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.017>
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and applied microbiology* 27:755-762. <https://doi.org/10.1078/0723202042369884>
- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA. 1991. Bacterial spot. En: *Compendium of Tomato Disease*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Mensit National, 73 p.

- Jones J, Lacy G, Bouzar H, Stall R, Schaad N. 2004. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27:755-762. <http://dx.doi.org/10.1078/0723202042369884>
- Joo GJ, Kim YM, Lee IJ. 2004. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnology Letters* 26:487-491. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019555.87121.34>
- Jouzani GS, Valijanian E, Sharafi R. 2017. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101:269. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8175-y>
- Ju-Hee K, Seong-Soo C, Ki-Kwon L, Ju-Rak Y, Wang-Hyu L. 2015. Determination of economic control thresholds for bacterial spot on red pepper caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Research in Plant Disease* 21:89-93. <https://doi.org/10.5423/RPD.2015.21.2.089>
- Kashyap BK, Solanki MK, Pandey AK, Prabha S, Kumar P, Kumari B. 2019. *Bacillus* as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a promising green agriculture technology. En: *Plant Health Under Biotic Stress* (pp. 219-236). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6040-4_11
- Keinath AP. 2019. Controlling bacterial spot on tomato and pepper. Available at: <http://lpress.clemson.edu/publication/controlling-bacterial-spot-on-tomato-and-pepper> (accessed December 07, 2020)
- Koenraad H, Van Betteray B, Germain R, Hiddink G, Jones JB, Oosterhof J. 2009. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. pp 99-102. En: Saygili H, Sahin F, Aysan Y. (eds) *II International Symposium on Tomato Diseases*, 8-12 October 2007, Kusadasi, TR. *Acta Hortícola*. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.808.13>
- Legein M, Smets W, Vandenhevel D, Eilers T, Muyschondt B, Prinsen E, Lebeer S. 2020. Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Frontiers in Microbiology* 11:1619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01619>
- Lanna RF, Souza RM, Marcelo M, Villela L, Edgar RJ, Pedro M, Resende LV. 2013. Induced defense responses in tomato against bacterial spot by proteins synthesized by endophytic bacteria. *Tropical Plant Pathology* 38:295-302. <http://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762013005000011>
- Leelavathi MS, Vani L, Pascal R. 2014. Antimicrobial activity of *Trichoderma harzianum* against bacteria and fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3:96-103.
- Li Y, Gu Y, Li J, Xu M, Wei Q, Wang Y. 2015. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers in Microbiology* 6:883. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>

- Liu Y, Lai Q, Dong C, Sun F, Wang L, Li G, Shao Z. 2013. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. Plos One 8:1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080097>
- Lichtenthaler H, Wellburn AR. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls "a" and "b" of leaf extracts in different solvents. Portland Press Limited, London <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Logan NA, De Vos P. 2015. Bergey's manual of systematics of Archaea and Bacteria. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00298>
- López CG, González PAG. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum*, L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. Revista Mexicana de Fitopatología 19:49-56. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=612/61219107>
- Lugo AC, García YEM, Rojas LAP, Valverde AR, Contreras RDM, Rojas JM. 2012. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "goteo en placa por sellado (o estampado) masivo". Revista colombiana de biotecnología 14:147-156.
- Ma A, Lv D, Zhuang X, Zhuang G. 2013. Quorum quenching in culturable phyllosphere bacteria from tobacco. International journal of molecular sciences 14:14607-14619. <https://doi.org/10.3390/ijms140714607>
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biología de los Microorganismos. Prentice Hall (2003).
- Maget DR, Ptak M, Peypoux F. 1985. Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. Biochimica et Biophysica Acta 815:405-409. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90367-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90367-0)
- Martin HL, Hamilton VA, Kopittke RA. 2004. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. Plant disease 88:921-924. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.9.921>
- Martínez-Bussenius C, Navarro CA, Jerez CA. 2017. Microbial copper resistance: importance in biohydrometallurgy. Microbial Biotechnology 10:279-295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12450>
- Mbega ER, Mabagala RB, Adriko J, Lund OS, Wulff EG, Mortensen CN. 2012. Five species of Xanthomonads associated with bacterial leaf spot symptoms in tomato from Tanzania. Plant disease 96:760-760. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0105-PDN>
- Medeot DB, Fernandez M, Morales GM, Jofré E. 2020. Fengycins from *Bacillus amyloliquefaciens* MEP218 exhibit antibacterial activity by producing alterations on the cell surface of the pathogens *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Frontiers in microbiology 10:3107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03107>
- Mirik M, Aysan Y, Çinar Ö. 2008. Biological control of bacterial spot disease of pepper with *Bacillus* strains. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 32:381-390.

- Mishra PK, Mishra S, Selvakumar G, Bisht JK, Kundu S, Gupta HS. 2009. Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:753–761 <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9963-z>
- Morinière L, Burlet A, Rosenthal ER, Nesme X, Portier P, Bull CT, Lavire C, Fischer-Le Saux M, Bertolla F. 2020. Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach leads to combine *Xanthomonas hortorum*. *Systematic and Applied Microbiology* 43:126087. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126087>
- Mormak D, Casida L. 1985. Study of *Bacillus subtilis* endospores in soil by use of a modified endospore stain. *Applied and environmental microbiology* 49:1356–1360
- Moura DR, Yamada JK, de Albuquerque LC, de Carvalho-Pontes N. 2020. Crop rotation reduces the density of volunteer plants in processing tomato fields and the inoculum of bacterial spot. *European Journal of Plant Pathology* 156:299–304. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01868-y>
- Ñacato CA, Valencia MF. 2016. Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp en *Brassica oleracea* var. *italica*. Universidad Politécnica Salesiana. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12144>
- Newberry EA, Bhandari R, Minsavage GV, Timilsina S, Jibrin MO, Kemble J, Sikora EJ, Jones JB, Potnis N. 2019. Independent evolution with the gene flux originating from multiple *Xanthomonas* species explains genomic heterogeneity in *Xanthomonas perforans*. *Applied and environmental microbiology* 85:00885–19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00885-19>
- Ongena M, Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiology* 16:115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.01.007>
- Otazú V, Chuquillanqui C. 2007. Producción de semilla de papa de calidad por aeroponía. Alternativas al uso del bromuro de metilo en la producción de semilla de papa de calidad. Lima (Perú) CIP. Documento de trabajo, 22007-2.
- Pajčin I, Vlajkov V, Frohme M, Grebinyk S, Grahovac M, Mojićević M, Grahovac J. 2020. Pepper bacterial spot control by *Bacillus velezensis*: Bioprocess solution. *Microorganisms* 8:1463. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101463>
- Park JS, ahaggirdar J, Cho Y, Park K, Lee S, Park K. 2010. Evaluation of *Bacillus subtilis* native strains for Plant Growth Promotion and Induced Systemic Resistance in tomato and red-pepper. *The Korean Journal of Pesticide Science* 14:407–414. Accesado el 28-enero-2021. Disponible en <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201015537949211.page>

- Park SH, Kim HJ, Kim JH, Kim TW, Kim HY. 2007. Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. *Journal of microbiology and biotechnology* 17:1177-1182.
- Patrignani A, Ochsner TE. 2015. Canopeo: A powerful new tool for measuring fractional green canopy cover. *Agronomy Journal* 107:2312-2320. <https://doi.org/10.2134/agronj15.0150>
- Pedraza LA, López CE, Uribe-Vélez D. 2020. Mecanismos de acción de *Bacillus* spp. (Bacillaceae) contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana* 25:112-125. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>.
- Potnis N, Timilsina S, Strayer A, Shantharaj D, Barak JD, Paret ML, Vallad GE, Jones JB, 2015. Bacterial spot of tomato and pepper: Diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular plant pathology* 16:907-920. <https://doi.org/10.1111/mpp.12244>
- Praça LB, Gomes ACMM, Cabral G, Martins ÉS, Sujii ER, Monnerat RG. 2012. Endophytic colonization by Brazilian strains of *Bacillus thuringiensis* on cabbage seedlings grown *in vitro*. *Bt Research* 3:11–19.
- Queiroz C, Lopes ML, Fialho E, Valente MV. 2008. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International* 24:361-375. <https://doi.org/10.1080/87559120802089332>
- Quezado DAM, Leite JRP, Lopes CA, Lima MF, Camargo LEA. 2005. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. En: Momol MT, Ji P, Jones JB. (eds), *International Symposium on Tomato Diseases*, 21 june 2004, Orlando, FL. *ActaHorticola* 695:101-108. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.11>
- Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 34:1037–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- Rabbee MF, Ali M, Baek KH. 2019. Endophyte *Bacillus velezensis* isolated from *Citrus* spp. Controls streptomycin-resistant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that causes citrus bacterial canker. *Agronomy* 9:470. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080470>
- Raddadi N, Cherif A, Boudabous A, Daffonchio D. 2008. Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. *Annal Microbiology* 58:47–52.
- Raman NM, Easwaran M, Kaul R, Bharti J, Motelb KFA, Kaul T. 2020. Antimicrobial resistance with special emphasis on pathogens in agriculture. En: Kumar Y. (ed.) *Antimicrobial Resistance. Intech Open*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.88440>
- Riaz U, Murtaza G, Anum W, Samreen T, Sarfraz M, Nazir MZ. 2021. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Biofertilizers and Biopesticides. En:

- Microbiota and Biofertilizers (pp. 181-196). *Springer*, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3_11
- Roach R, Mann R, Gambley CG, Shivas RG, Chapman T, Rodoni B. 2020. Pathogenicity and copper tolerance in Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot. *Crop Protection* 127:104923.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104923>
- Robles-Hernández L, Ojeda-Barrios D, González-Franco A, Hernández-Huerta J, Salas-Salazar N, Hernández-Rodríguez OA. 2017. Susceptibilidad de aislados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* a *Streptomyces* y extractos bioactivos de *Ganoderma*. *Acta Universitaria* 27:30-39.
<http://dx.doi.org/10.15174/au.2017.1417>
- Rombouts S. 2017. Management of the Bacterial Pathogens *Xanthomonas Campestris* pv. *campestris* and *Pseudomonas syringae* pv. *porri* in Cabbage and Leek Production using Novel Bacteriophages. Tesis doctoral. Facultad de Ingeniería de Biociencias de la KU Leuven.
- Rojas M, Peña M, Peña-Vera MJ. 2019. Characterization and determination of antimicrobial and metal resistant profiles of *Xanthomonas* strains isolated from natural environments. *Journal of Analytical and Pharmaceutical Research* 8:55-60.
<https://doi.org/10.15406/japlr.2019.08.00312>
- Sadeghi A, Mortazavi SA, Bahrami AR, Sadeghi B. 2012. Design of multiplex PCR for simultaneous detection of rope-forming *Bacillus* strains in Iranian bread dough. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92:2652-2656.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.5681>
- Samaniego B, Garruña R, Tun J, Kantun J, Reyes A, Cervantes L. 2016. *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76:409-416.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392016000400003>
- Saxena AK, Karthikeyan N, Rajawat MVS. 2017. Microbial interventions for improving phosphorus and potassium nutrition in plants. *Indian Journal Fertilisers* 13:128–137.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (No. Ed. 3). *American Phytopathological Society* (APS Press).
- Seon M, Soo J, Ji Y, Kee D, Youl S. 2014. Alleviation of Salt Stress in Pepper (*Capsicum annum* L.) plants by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal Microbiology Biotechnology* 27:1790–1797. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1609.09042>
- Sicuia OA, Grosu I, Constantinescu F, Voaid C, Petruña CC. 2015. Enzymatic and genetic variability in *Bacillus* spp. strains with plant beneficial qualities. *AgroLife Scientific Journal* 4:124-131.

- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. Saint Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press). 373 pp. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013064240>
- Shafi J, Tian H, Ji M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31:446-459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shine MB, Xiao X, Kachroo P, Kachroo A. 2019. Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science* 279:81-86. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.01.001>
- SIAP (2019). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Secretaría de Desarrollo Rural. Available at: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do (accessed December 07, 2020)
- Son JS, Sumayo M, Hwang YJ, Kim BS, Ghim SY. 2014. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria as elicitor of systemic resistance against gray leaf spot disease in pepper. *Applied soil ecology* 73:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.07.016>
- Stall REC, Beaulieu D, Egel NC, Hodge RP, Leite, GV, Minsavage. 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 44:47-53. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-47>
- Stoyanova M, Vancheva T, Moncheva P, Bogatzevska N. 2014. Differentiation of *Xanthomonas* spp. causing bacterial spot in Bulgaria based on biolog system, *International Journal of Microbiology* 2014, Article ID 495476. <https://doi.org/10.1155/2014/495476>
- Strayer-Scherer A, Liao YY, Young M, Ritchie L, Vallad GE, Santra S, Freeman JH, Clark D, Jones JB, Paret ML. 2018. Advanced copper composites against copper-tolerant *Xanthomonas perforans* and tomato bacterial spot. *Phytopathology* 108:196-205. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0221-R>
- Sundin GW, Wang N. 2018. Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 56:161-180. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045946>
- Taylor P, Reeder R. 2020. Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors. *CABI Agriculture and Bioscience* 1:1-14. <https://doi.org/10.1186/s43170-020-00001-y>
- Tejera B, Rojas M, Heydrich M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42(3), 131-138. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181222321004>

- Terumi IA, Batista TJ, Fernandes da ST, Soman JM, Maringoni AC. 2015. Chemical products induce resistance to *Xanthomonas perforans* in tomato. *Brazilian Journal of Microbiology* 46:701-706. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246320140177>
- Thasana N, Prapagdee B, Rangkadilok N, Sallabhan R, Aye SL, Ruchirawat S, Loprasert S. 2010. *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtilin A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated β -amino acid. *FEBS letters* 5844:3209-3214. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.005>
- Tunsagool P, Jutidamrongphan W, Phaonakrop N, Jaresitthikunchai J, Roytrakul S, Leelasuphakul W. 2019. Insights into stress responses in mandarins triggered by *Bacillus subtilis* cyclic lipopeptides and exogenous plant hormones upon *Penicillium digitatum* infection. *Plant Cell Reports* 38:559–575. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02386-1>
- Tyagi S, Mulla SI, Lee KJ, Chae JC, Shukla P. 2018. VOCs-mediated hormonal signaling and crosstalk with plant growth promoting microbes. *Critical Review in Biotechnology* 38:1277–1296. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472551>
- Umesha S, Avinash P. 2015. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas perforans*. *3 Biotech* 5:245–252. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0223-z>
- Vallad GE, Pernezny KL, Balogh B, Wen A, Figueiredo JFL, Jones JB, Momol T, Muchovej R, Havranek N, Abdallah N, Olson S. 2010. Comparison of kasugamycin to traditional bactericides for the management of bacterial spot on tomato. *HortScience* 45:1834-1840. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.12.1834>
- Valarmathi P. 2020. Antibiotics-miracle drugs as crop protectants: A review. *Agricultural Reviews* 41:43-50. <http://dx.doi.org/10.18805/ag.R-1941>
- Vázquez C, Martín A, de Silóniz MI, Serrano S. 2011. Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. *Reduca (Biología)* 3:5.
- Velásquez-Valle R, Reveles-Torres LR, Mauricio-Castillo JA. 2014. Incidencia de enfermedades parasitarias de chile en el Norte Centro de México. *Folleto Técnico*, (52).
- Velásquez VR, Medina AMM. 2005. La mancha bacteriana del chile: una nueva amenaza en Aguascalientes y Zacatecas. *Folleto Técnico* No. 23. INIFAP. Centro de Investigación Regional Norte Centro, Campo Experimental Pabellón. Aguascalientes, Aguascalientes, México. 11 p.
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, Santos-Villalobos SDL. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología* 36:95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Vicente JG, Holub EB. 2013. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops.

- Molecular Plant Pathology 14:2-18. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00833.x>
- Voloudakis AE, Reignier TM, Cooksey DA. 2005. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Applied and environmental microbiology 71:782-789. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.782-789.2005>
- Wei F, Hu X, Xu X. 2016. Dispersal of *Bacillus subtilis* and its effect on strawberry phyllosphere microbiota under open field and protection conditions. Scientific Reports 6:22611. <https://doi.org/10.1038/srep22611>
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature protocols 3:163. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Worthington RJ, Rogers SA, Huigens RW, Melander C. 2012. Foliar-Applied Small Molecule that Suppresses Biofilm Formation and Enhances Control of Copper-Resistant *Xanthomonas euvesicatoria* on Pepper. Plant Disease 96:1638-1644. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0190-RE>
- Yang JW, Yu SH, Ryu CM. 2009. Priming of defense-related genes confers root-colonizing bacilli-elicited induced systemic resistance in pepper. Plant Pathology Journal 25:389-399.
- Yanti Y, Nasution CR. 2017. Effectivity of *Bacillus cereus* to control *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* and growth promoting of chili pepper. Journal of Biopesticides 10:113-119.
- Yanti Y, Habazar T, Resti Z. 2017. Formulasi padat rhizobakteria indigenus *Bacillus thuringiensis* Ts2 dan waktu penyimpanan untuk mengendalikan penyakit pustul bakteri *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika, 17:9-18. <https://doi.org/10.23960/j.hptt.1179-18>
- Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology 47:138-145. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>
- Zerriouh H, Romero D, García-Gutiérrez L, Cazorla FM, de Vicente A, Pérez-García A. 2011. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. Molecular plant-microbe interactions 24:1540-1552. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0162>
- Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q, Rajoka MSR, Yang H, Jin. 2017. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. Applied Microbiology in Biotechnology 101:5951–5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
- Zhao P, Xue Y, Gao W, Li J, Zu X, Fu D. 2018. Bacillaceae-derived peptide antibiotics since 2000. Peptides 101:10–16. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.018>

RESUMEN BIOGRÁFICO

Jared Hernández Huerta

Candidato a Grado de

Doctorado en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: FORMULACIÓN DE UN PRODUCTO BIOLÓGICO A BASE DE *Bacillus* spp. PARA EL CONTROL DE LA MANCHA BACTERIANA CAUSADA POR *Xanthomonas euvesicatoria* Y LA PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.)

Campo de estudio: Ciencias agropecuarias

Datos personales: Nacido en Orizaba, Veracruz de Ignacio de la Llave el 19 de febrero de 1984, hijo de Juan Antonio Hernández Domínguez y María de la Luz Huerta Santos.

Educación: Egresado del Instituto Tecnológico Ursulo Galván, grado obtenido Ingeniero en Agronomía en 2006. Egresado de la Universidad Autónoma de Chihuahua, grado obtenido Maestría en Ciencias de la Productividad Frutícola en 2008.

Experiencia profesional: Maestro de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Chihuahua desde 2009.

Prevalence of *Xanthomonas euvesicatoria* (formally *X. perforans*) associated with bacterial spot severity in *Capsicum annuum* crops in South Central Chihuahua, Mexico

Jared Hernández-Huerta¹, Patricia Tamez-Guerra², Ricardo Gomez-Flores², Ma. Carmen E. Delgado-Gardea³, Margarita S. García-Madrid³, Loreto Robles-Hernández¹ and Rocio Infante-Ramirez³

¹ Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Campus 1, Chihuahua, Chihuahua, México

² Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México

³ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Circuito Nuevo Campus, Chihuahua, Chihuahua, México

ABSTRACT

Background: *Xanthomonas* spp. causes bacterial spot disease, which reduces quality and yield of pepper crops in Mexico. Identification of phytopathogen species is necessary to implement more effective control strategies.

Objective: The aim of this study was to isolate and identify infecting *Xanthomonas* species in South Central Chihuahua pepper-producing areas.

Methods: Diseased plants were collected from 30 cultivation lots and bacteria were isolated from damaged tissues. Potential causative agents were isolated, identified, and characterized by biochemical and molecular analysis. Pathogenicity tests from each isolate were then performed on 30-d-old pepper seedlings, exposing five leaves to 10 µL of 1×10^8 CFU/mL bacterial suspensions of each isolate, using sterile distilled water as a control. Disease severity was determined after 10 d by calculating leaf damage percentage. Furthermore, we evaluated the susceptibility of the highest bacterial spot severity-causing isolates (13 isolates) to copper sulphate (CuS), copper gluconate (CuG), copper oxychloride + oxytetracycline hydrochloride (Cu + Ox), gentamicin + oxytetracycline hydrochloride (Gen + Ox), and gentamicin sulphate (GenS). Copper-resistance genes (*copLAB*) were detected by PCR analysis among isolates.

Results: Thirty-seven foliage isolates were identified as *Xanthomonas euvesicatoria* (14%), which were associated with bacterial spot disease in jalapeño pepper. Tested *Xanthomonas* isolates were resistant to Cu-based compounds, but susceptible to Cu + Ox. All isolates were susceptible to Gen + Ox and GenS. *CopLAB* genes were detected in all but one strain.

Conclusions: *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*) may be considered as an emerging pathogen of bacterial spot pepper in Mexico. Among disease management strategies, alternatives to copper should be taken into consideration.

Submitted 27 August 2020
Accepted 17 January 2021
Published 15 February 2021

Corresponding authors
Patricia Tamez-Guerra,
patricia.tamezgr@uanl.edu.mx
Rocio Infante-Ramirez,
rinfante@uach.mx

Academic editor
Gunjan Arora

Additional Information and
Declarations can be found on
page 13

DOI 10.7717/peerj.10913

© Copyright
2021 Hernández-Huerta et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Subjects Agricultural Science, Microbiology, Plant Science

Keywords *Xanthomonas*, Bacteriosis severity, Jalapeño pepper, Antibacterial agents, Copper resistance

INTRODUCTION

Chili pepper crop (*Capsicum annuum* L.) production in Mexico is an important agricultural activity, because of its high profitability, demand, and consumption. Chihuahua State represents the second most important pepper producer in the country (SIAP, 2018). In Mexico, pepper crop yield reaches up to 25.51 ton/ha. However, diseases such as bacterial spot reduce yield to up to 66%, which represents about \$7,500 dollars loss per ha (SIAP, 2018; Sharma & Bhattarai, 2019). Bacterial infection is disseminated among leaves, stems, and fruits, and is characterized by the presence of necrotic spots with chlorotic halos. Spots begin as small watery consistency pustules that become brown with chlorotic halos, resulting in early defoliation, loss of metabolism, and poor product quality (European, Mediterranean Plant Protection Organization, 2013; Keinath, 2019). Potential bacterial spot causative agents include *Xanthomonas euvesicatoria*, *X. gardneri*, *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*), and *X. vesicatoria* (Jones et al., 2004). *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, and *X. gardneri* strains have been reported as pathogenic for pepper and tomato, whereas *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*) strains only infect tomato plants (Jones et al., 2004).

After analyzing *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains phylogeny against *X. axonopodis* species taxonomy, a reclassification of *X. perforans* and *X. euvesicatoria* as the same *Xanthomonas* species was proposed (Constantin et al., 2016). In fact, authors recommended *X. citri*, *X. phaseoli*, and *X. axonopodis* taxonomic emendations to encompass the PG I, PG III, and PG IV strains, respectively, and *X. perforans* and *X. alfalfae* reclassification as *X. euvesicatoria* to encompass all *X. euvesicatoria* strains as PG II strains. In addition, the reclassification of *X. campestris* pv. *vitians* has been recently emended (Morinière et al., 2020). *X. euvesicatoria* (formerly *X. perforans*) presence in pepper crops has been reported in some studies, which is considered atypical. In fact, strains identified as *X. perforans* were isolated from pepper plants from Florida and Alabama (Potnis et al., 2015; Newberry et al., 2019). Following reclassification changes, the presence of *X. perforans*, now identified as *X. euvesicatoria*, infecting pepper plants, results reasonable. In Mexico, *X. euvesicatoria* and *X. perforans* have been reported infecting tomato, but not pepper plants (Timilsina et al., 2015).

Bacterial spot management includes the use of certified healthy seeds and pathogen-free seedlings, seed treatment with hot water, weed control, and crop rotations (Moura et al., 2020). Furthermore, copper applications or antibiotics are used to control the bacterial spot on tomato and pepper crops (Keinath, 2019). However, antibiotics- or copper-resistant *Xanthomonas* spp. in vegetable crops have been widely distributed in various regions of the globe (Hamza et al., 2010; Abbasi et al., 2015; Areas et al., 2018; Strayer-Scherer et al., 2018; Griffin et al., 2017; Zhang et al., 2013). Bacterial control has been difficult because of its high variability (European, Mediterranean Plant Protection Organization, 2013). Knowledge of the causative agent and antibiotics resistance profile

will allow the implementation of more effective control strategies. The presence of copper-resistant or copper-tolerant *Xanthomonas* species causing bacterial spot in Mexico has been reported since 2001 ([Carrillo-Fasio et al., 2001](#)). However, along the Chihuahua pepper crop area, their prevalence among infective strains and persistence after copper-based products application for their control are still unknown. The leading evolutionary processes to *X. perforans* new lineages emergence was identified in Alabama, where this species has expanded its host range (it had previously been reported as tomato pathogen, but not infecting pepper) ([Newberry et al., 2019](#)). [Newberry et al. \(2019\)](#) also reported a new effector (PthXp1) and different phylogenetic groups that have undergone independent recombination events from multiple *Xanthomonas* species, suggesting a continuous gene flow between Xanthomonadales in association with several host plants, resulting in new lineages emergence. Therefore, the aim of this study was to isolate and identify *Xanthomonas* species infecting plants along the Central South pepper-producing area of Chihuahua, determine their susceptibility to copper-based and oxytetracycline and gentamicin antibacterial compounds, and identify copper-resistance related genes among *Xanthomonas* isolates to discriminate between resistance or tolerance to copper.

MATERIALS AND METHODS

General microbiology culture media and reagents for assays and biochemical tests were purchased from Sigma-Aldrich Química de México (Toluca de Lerdo, MX), unless otherwise specified, whereas molecular biology assay reagents were obtained from Promega Corp. (Madison, WI, USA).

Samples collection

Thirty commercial pepper cultivation lots from the South Central region of Chihuahua State were selected, collecting five samples per lot from plants with bacterial spot symptoms. Samples were then bagged in zip-lock bags, labeled, and transported at 4 °C to our facilities for laboratory processing.

Causative agent isolation

Leaves with signs of disease were surface sterilized by dipping in 0.5% sodium hypochlorite for 2 min, followed by three rinses in sterile distilled water. Small leaf sections were cut from the spot margin and individually macerated in 500 µL of sterile distilled water, using a sterile mortar and pestle. Resulting suspensions were streaked onto nutrient agar (NA; BD Difco Laboratories, Sparks Maryland, MD, USA) ([Shaad, Jones & Chun, 2001](#)) and plates incubated at 27 °C for 48 h, after which they were examined for bacterial colonies development. Pure cultures of bacterial strains were obtained by colony sub-culturing. Collected bacteria cultures were suspended in sterile 0.85% saline solution and stored at 4 °C, until use.

Phenotypic characterization

Bacterial isolates were subjected to standard biochemical and physiological testing ([Shaad, Jones & Chun, 2001](#)). Strains were cultured in semi-selective SX medium (10 g starch, 1 g

beef extract, 5 g ammonium chloride, and 2 g K_2HPO_4), 1 mL of methyl violet 2B (1% solution in 20% ethanol), 2 mL of methyl green (1% aqueous solution), 15 g agar, and 5 mL of cycloheximide (5.0 g to 10 mL methanol and adjusted to 100 mL with sterile water), and were negative for anaerobic growth and fluorescence development on King's B medium (20 g proteose peptone, 1.5 g K_2PO_4 , 1.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 mL glycerol, and 15 g agar).

Amylolytic activity of bacterial cultures was tested on nutrient agar plates (BD Difco Laboratories, Sparks Maryland, MD, USA), containing 0.2% soluble starch (Jones *et al.*, 2004). In addition, we performed Gram staining (Hycel[®], Zapopan, Jalisco, México), oxidase and catalase activities, aerobic/anaerobic growth, and colony characteristics on yeast extract dextrose calcium carbonate agar medium (YDC), containing 10 g/L yeast extract (BD Difco Laboratories, Sparks Maryland, MD, USA), 20 g/L dextrose, 20 g/L calcium carbonate (Fagalab, Sinaloa, México), and 15 g/L agar (BD Difco Laboratories, Sparks Maryland, MD, USA). In YDC medium, *Xanthomonas* species develop yellow, convex, and mucoid colonies. *X. campestris* ATCC 1395 strain was used as a positive control in all tests.

DNA extraction

DNA extraction was achieved by the phenol-chloroform modified method (Bardakci & Skibinski, 1994). In brief, 1.5 mL of each bacterial isolate grown in nutrient broth medium for 24 h, was centrifuged twice at 12,000 rpm for 5 min at 4 °C, after which supernatant was discarded. Next, 100 µL of 10% sodium dodecyl sulfate, 5 M NaCl, and 10% cetyltrimethylammonium bromide were added, and mixture was homogenized by vortexing at 3,400 rpm (VX-200; Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA), followed by incubation for 10 min at 65 °C in a water bath. After this, 750 µL of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) mixture was added, mixed by vortexing at 3,400 rpm and centrifuged at 12,000 rpm for 5 min at 4 °C. In order to precipitate the DNA, supernatant was collected, and 500 µL isopropanol were added. The mixture was then carefully stirred by vortexing at low speed 2,000 rpm and placed in the freezer at 20 °C for 24 h, after which solution was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min at 4 °C and supernatant was discarded. The precipitate was then washed twice with 300 µL of 70% ethanol, centrifuged for 10 min, dried at 25 °C for 30 min, and suspended in 50 µL of Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-HCl and 1 mM disodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution at pH 8).

PCR protocol

Samples concentration was obtained with the Eppendorf BioSpectrometer basic (Eppendorf do Brasil Ltda., Mexico City) and adjusted to 5 ng/µL. To determine the causative agent of spot disease, a multiplex PCR was performed, using the specific primers pairs BsXeF/BsXeR, BsXvF/BsXvR, BsXgF/BsXgR, and BsXpF/BsXpR for *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, and *X. perforans*, respectively (Koenraad *et al.*, 2009) (Table 1) and the following amplification program: an initial denaturation cycle at 94 °C for 5 min, then 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, alignment at 64 °C for 1 min,

Table 1 PCR primers used to identify the causative agent of pepper bacterial spot disease^a. Selected primers used to identify the causative agent of pepper bacterial spot disease

Primer name	5'3' sequence	Amplicon size (bp)	Ann. Temp. (°C)	Target species
Bs-XeF	CATGAAGAAGCTCGGCGTATCG	173	64	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
Bs-XeR	GTCGGACATAGTGGACACATAC			
Bs-XvF	CCATGTGCCGTTGAAATACTTG	138	64	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>
Bs-XvR	ACAAGAGATGTTGCTATGATTTGC			
Bs-XgF	TCAGTGCTTAGTTCCTCATTTGTC	154	64	<i>Xanthomonas gardneri</i>
Bs-XgR	TGACCGATAAAGACTGCGAAAG			
Bs-XpF	GTCGTGTTGATGGAGCGTTC	197	64	<i>Xanthomonas perforans</i>
Bs-XpR	GTGCGAGTCAATTATCAGAATGTGG			

Note:

^a Koenraadt et al. (2009).

and extension at 72 °C for 1 min, and a final extension cycle at 72 °C for 7 min. Results were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel, using 1X ethidium bromide as an intercalating agent, for 120 min and observing in a GenLogic 200 photodocumenter (Kodak, New York, NY, USA).

***copLAB* genes detection**

Detection of *copLAB* genes was performed in the selected isolates from the antimicrobial susceptibility test. Primers used for copper resistance genes were described by Behlau et al. (2013). PCR reaction mixture were performed using a volume of 25 µL. Each PCR reaction mixture consisted of 25 µL sample mixed with 15.5 µL sterile water, 5 µL of 5X PCR buffer, 1.5 µL of 25 mM MgCl₂, 0.8 µL of 25 mM dNTP's (EUA; PROMEGA, Madison, WI, USA), 1 µL of each primer (10 µM stock concentration), 1 µL of 5 ng/µL DNA template, and 0.2 µL of 5 U/µL Taq DNA polymerase (PROMEGA, Madison, WI, USA). PCR reactions were performed following the Behlau et al. (2013) protocol. Results were analyzed by electrophoresis in a 2.0% agarose gel, using 1X ethidium bromide as an intercalating agent, for 120 min and observed under a GenLogic 200 photodocumenter (Kodak, New York, NY, USA).

Pathogenicity test

Bacterial isolates were evaluated for their pathogenicity on pepper seedlings (*Capsicum annuum* var M Southern Star Seeds S. de R.L. de C.V., Mexico City). Seedlings were grown in 10-cm diameter pots with sterile expanded perlite particles, under a 16 h light at 28 °C and 8 h dark at 18 °C. Pathogenicity tests were conducted on 30-d-old pepper seedlings. Before and after testing, seedlings were conditioned two days in darkness, with relative humidity above 90% in a closed 27-gallon plastic chamber (Plastic Trends, Jalisco, Mexico). Bacterial suspensions were prepared from a 24-h-old culture grown on nutrient broth medium at a concentration of 1×10^8 colony forming units (CFU) per milliliter, corresponding to an optical density (OD) of 0.01 at 600 nm by UV-visible

spectrophotometry (Evolution 60 S; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) (Mbega *et al.*, 2012). Next, 10 µL of each bacterial suspension were infiltrated into leaves using Plastipak SFP 1 mL syringes (Becton-Dickinson, Brooklyn, NY, USA), and sterile distilled water as a control. Three leaves were infiltrated with two dots in five seedlings for each bacterial isolate. Disease severity was determined after 5 and 10 d, calculating the leaf damage percentage, using the Canopeo app (<https://canopeoapp.com>). Canopeo is an application that uses a red, green, and blue (RGB) system. It produces pixels analysis according to R/G, B/G ratios, and the green index excess. Results are interpreted in binary images where white pixels represent the pixels that satisfied the selection criteria (green canopy), whereas black pixels represent the pixels that did not comply with the selection criteria (not green canopy) (Patrignani & Ochsner, 2015). Severity was evaluated considering green percentage present in leaves. A 100% value was associated with healthy leaves, whereas lower percentages were considered as *Xanthomonas* damaged leaves.

Copper, gentamicin, and oxytetracycline susceptibility testing

Susceptibility of 13 isolates to antibacterial products was evaluated by the broth dilution method (Wiegand, Hilpert & Hancock, 2008).

Tested isolates were selected based on the highest disease severity evidenced in the pathogenicity test, as well as five strains with medium, and other four showing low severity. The evaluated products were Glucob Plus[®] (8% copper gluconate + 1% citric acid (CuG)), Coboxy[®] (45% copper oxychloride + 37.7% oxytetracycline hydrochloride (Cu + Ox)), Final Bacter (2% gentamicin + 6% oxytetracycline hydrochloride (Gen + Ox)), gentamicin sulphate (GenS), and copper sulphate pentahydrate (CuS). For minimum inhibitory concentration (MIC) analysis, antimicrobial dilutions were prepared at 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, and 640 µg/mL in tryptone soy broth (TSB). Microbial resistance was defined by *Xanthomonas* growth on copper compounds at 200 µg/mL (Zhang *et al.*, 2013; Roach *et al.*, 2020), on Ox at 25 µg/mL (Farfán, Benítez & Carvajal, 2014), and on gentamicin at 25 µg/mL (Rojas, Peña & Peña-Vera, 2019). In addition, pH values from all the antimicrobial tested and their dilutions were determined.

Bacterial suspensions were adjusted to 0.5 McFarland standard (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) by turbidimetry, which is equivalent to 1×10^8 CFU/mL in TSB. Bacterial suspension was mixed and diluted to 1:100. Next, 50 µL of bacterial suspension plus 50 µL of antimicrobial solution were placed in a microplate, using 100 µL of TSB as a negative control, and 50 µL TSB + 50 µL of each antimicrobial as blank and TSB + bacterial suspension as positive control. Final inoculum contained 5×10^5 CFU/mL. Microplates were then sealed with Parafilm and incubated at 28 °C for 48 h under constant shaking at 225 rpm. After incubation, ODs were read in a Varioskan Flash microplate reader (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at 600 nm for MICs determination. Bacterial growth was confirmed by seeding 10 µL of each treatment plus 990 µL of TSB in NA and incubating at 28 °C for 48 h. Tests were performed in triplicate.

Data analysis

Results from pathogenicity tests were statistically analyzed by the Minitab Statistical Software v.16. Bacterial spot severity results were evaluated by cluster analysis, using the Spearman average linked method. Euclidean distance measure was performed with the InfoStat software (InfoStat version 2009; Grupo InfoStat, Córdoba, Argentina). Phytopathogens were grouped (clusters) into the following categories: (1) isolates that cause high severity, (2) isolates causing medium severity, and (3) isolates causing low severity. From these categories, some representative microorganisms were selected for antimicrobial susceptibility testing.

Antibacterial agents susceptibility data were analyzed by comparing the ODs of the interactions between *Xanthomonas* and antimicrobials at different concentrations, testing concentrations of resistance MIC values for gentamicin, copper and oxytetracycline, reported by [Rojas, Peña & Peña-Vera \(2019\)](#), [Roach et al. \(2020\)](#) and [Farfán, Benítez & Carvajal \(2014\)](#), respectively.

RESULTS

Isolation and identification of the causative agent

In the present study, we isolated 43 *Xanthomonas* spp. strains from chili pepper leaves with characteristic infection of bacterial spots. Colonial morphology on YDC medium showed yellow, mucoid, smooth, circular, and convex colonies with entire margins ([Fig. S1](#)). Xanthomonads were gramnegative, and positive for catalase and KOH test. According to biochemical tests, these bacterial isolates belong to the *Xanthomonas* genus. In addition, 37 isolates (87%) showed strong amyolytic activity, associated with *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*) species, whereas 6 isolates (14%) did not possess amyolytic activity and were associated with *X. euvesicatoria* species.

Molecular characterization of the causative agent

The amplification of 197 bp fragment of 37 isolates with species-specific primers Bs-XpF/Bs-XpR, confirmed them as *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*). In addition, the amplification of 197 bp fragment of six isolates with species-specific primers Bs-XeF/Bs-XeR, confirmed them as *X. euvesicatoria*. No amplification was observed for negative controls and other species-specific primer pairs did not amplify DNA, which confirmed that the isolates do not belong to *X. vesicatoria* or *X. gardneri* ([Fig. S2](#)).

Pathogenicity tests

All inoculated pepper leaves with *Xanthomonas* isolates showed signs of bacterial spot. About 5 to 10 d after inoculation, infection was characterized by watery spots, leaves with chlorosis and perforation of leaf lamina, and necrotic spots with chlorosis and defoliation. Negative control plants remained healthy ([Fig. 1](#)).

Cluster analysis of the severity of bacteria spot Xanthomonads were classified into three conglomerates, according to their virulence on both evaluations (5 d and 10 d); 9.3% of isolates [all *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*)] caused the highest damage to pepper leaves, from 5 d to the end of the evaluation period, with a final severity of 92.6%.

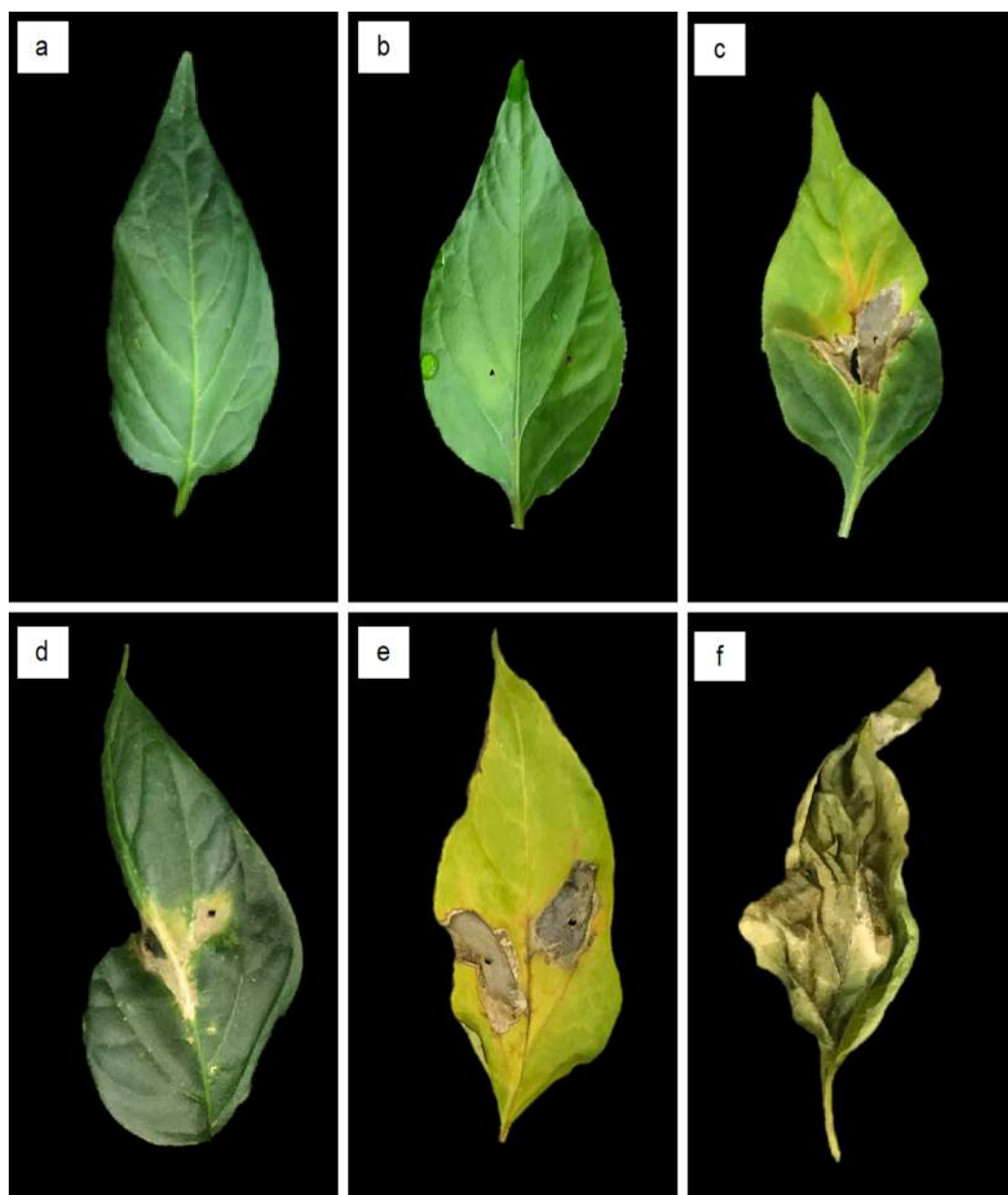


Figure 1 Bacterial spot symptoms induced in jalapeño pepper leaves 10 d after inoculation by *Xanthomonas* isolates from bacterial spot lesions of pepper plants. Bacterial spot symptoms induced in jalapeño pepper leaves 10 d after inoculation by *Xanthomonas* isolates from bacterial spot lesions of pepper plants: (A) healthy leaf treated with 0.25% saline solution; (B) water spots on the upper leaf epidermis; (C) necrotic spot with yellowing and rupture of leaf lamina; (D) necrotic spots with leaf deformation; (E) necrotic spots with leaf chlorosis; and (F) leaf fall and necrosis.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.10913/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.10913/fig-1)

In addition, 25.6% of isolates (ten *X. perforans* and one *X. euvesicatoria*) caused medium damage with 76.8% final severity, and 65.1% (23 isolates were identified as *X. perforans* and 5 as *X. euvesicatoria*) induced low damage with 29.8% severity (Table 2). Medium-severity and low-severity groups showed 54.0% and 13.9% increases in damaged pepper leaves, respectively (Fig. 1).

Table 2 Severity of bacterial spot isolates in jalapeño chili pepper seedlings. Indicates the *Xanthomonas* isolates that resulted in higher bacterial spot severity in jalapeño chili pepper seedlings.

Conglomerate	Severity description	Isolate given number	Severity (%)		Isolates ^b
			5 days ^a	10 days	
1	High	4	67.46	92.58	<i>Xp21, Xp47, Xp60, Xp69</i>
2	Medium	11	22.72	76.75	<i>Xp19, Xp24, Xp25, Xp34, Xp43, Xp45, Xp48, Xp50, Xp61, Xe65, Xp66</i>
3	Low	28	15.90	29.83	<i>Xp1, Xp2, Xp3, Xe4, Xp5, Xp6, Xp11, Xp14, Xe15, Xp16, Xp20, Xp22, Xe23, Xp30, Xp31, Xp35, Xp36, Xe37, Xp41, Xe42, Xp46, Xp49, Xp52, Xp53, Xp54, Xp56, Xp58, Xp63</i>

Notes:

^a Days after leaf inoculation.

^b *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe) and *X. perforans* (Xp).

Table 3 Susceptibility of pepper bacterial spot-associated *Xanthomonas* strains^a to copper-based compounds, oxytetracycline, and gentamicin. Higher or lower tested concentrations showing the same result as the last one were not depicted.

Compounds	Conc. (µg/mL)	Low				Medium					High				MIC
		Xe4	Xp16	Xp3	Xp11	Xp25	Xp43	Xp48	Xp50	Xp6	Xp21	Xp47	Xp60	Xp69	
Copper Sulphate	640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Glucob Plus® (8% Copper Gluconate + 1% Citric Acid)	640	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
Coboxy® (45% Copper Oxychloride + 37.7% Oxy-tetracycline Hydrochloride)	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	4-32
	8	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	
	16	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Final Bacter® (6% Oxy-tetracycline + 2% Gentamicin)	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	32
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gentamicin	4	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	4-32
	8	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	
	16	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	
	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Note:

^a *Xanthomonas euvesicatoria* (Xe) and *X. euvesicatoria* formally *perforans* (Xp); no bacterial growth (-); satisfactory bacterial growth on TSB (+); and minimum inhibitory concentration (MIC).

Antimicrobial susceptibility testing

Evaluated *Xanthomonas* strains were resistant to CuS and CuG at all concentrations tested. However, all strains were susceptible to Cu + Ox at ≥ 32 µg/mL. In addition, strains did not grow in Gen + Ox or Gen at 32 µg/mL. Furthermore, microbial growth from *Xp47* and *Xp60* (the most virulent strains) was inhibited by Cu + Ox at 4 µg/mL. In general, 47% of strains did not grow when exposed to Gen at > 4 µg/mL. Since *Xanthomonas* strains were resistant to CuS and CuG, the MIC could not be determined. Calculated MIC of Cu + Ox was from 4 µg/mL to 32 µg/mL, MIC of GenS was from 4 µg/mL to 32 µg/mL, and MIC of Gen + Ox was 32 µg/mL (Table 3). After analyzing the pH values of the antimicrobial agents tested and their dilutions, pH ranged from 6.48 to 7.38 (Table S1).

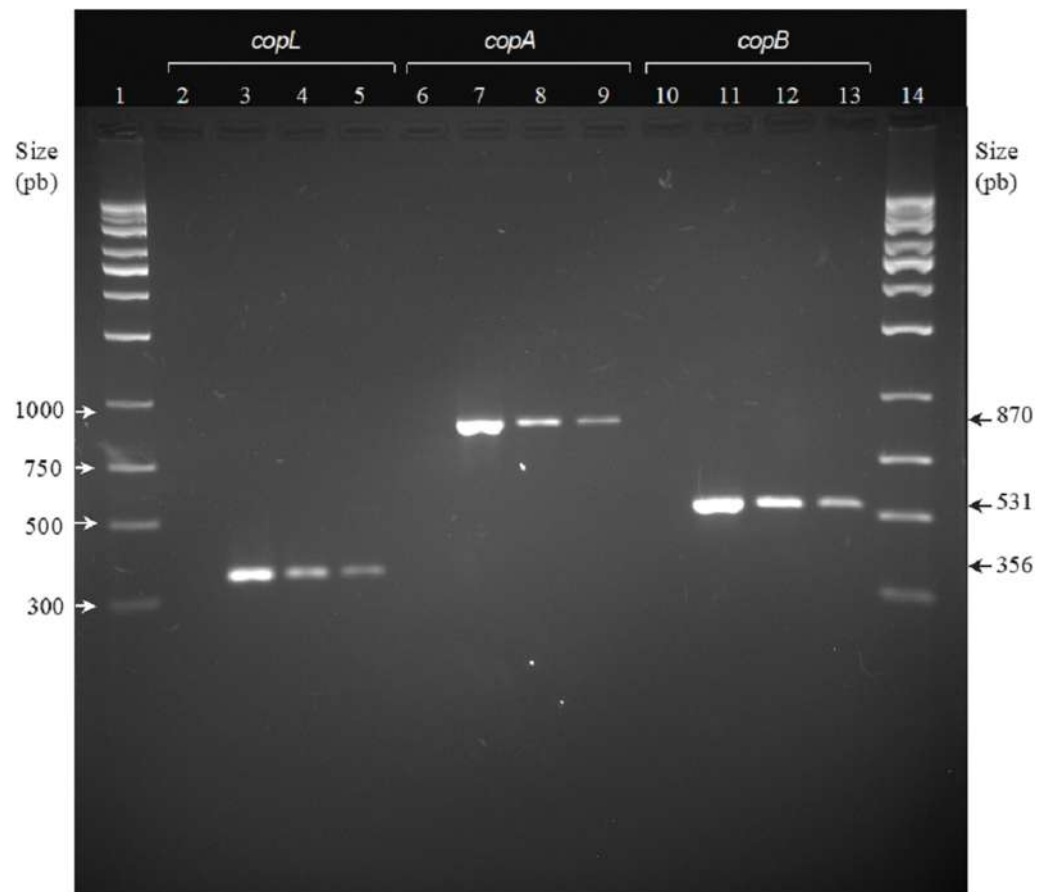


Figure 2 Agarose gel electrophoresis. PCR analysis of copper resistance (CuR) genes *copL*, *copA*, and *copB*. Lanes: (1) 1,000-bp DNA weight ladder; (2,6 and 10) negative control; (3, 7, and 11) *copL*, *copA*, and *copB* of *Xanthomonas campestris* ATCC 1395, respectively; (4, 8, and 12) *copL*, *copA*, and *copB* of *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*) Xp48, respectively; (5, 9, and 13) *copL*, *copA*, and *copB* of *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*) Xp60, respectively. [Full-size !\[\]\(1679558f37f6db0dd8360a2a7e913e90_img.jpg\) DOI: 10.7717/peerj.10913/fig-2](https://doi.org/10.7717/peerj.10913/fig-2)

Copper resistance genes detection

Most *Xanthomonas* strains showed resistance to copper, since *copLAB* genes were detected. The *copL*, *copA*, and *copB* genes had a molecular weight of 356, 870, and 531 bp, respectively (Fig. 2). However, *copLAB* genes were not detected in the Xp3 strain.

DISCUSSION

Xanthomonas euvesicatoria (formally *X. perforans*) has not been reported as causative agent of pepper bacterial spot in Chihuahua, México. Previous studies have reported *X. euvesicatoria* or *X. campestris* pv. *vesicatoria* (name prior to the reclassification by Jones et al. (2004)) as causative agents of this disease (Guigón-López & González-González, 2001; Chávez-Dozal et al., 2012; Robles-Hernández et al., 2017). Moreover, *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*) strains were recently isolated from pepper plants in USA, suggesting a recent expansion of these species host, implying an emerging threat to pepper production (Potnis et al., 2015; Newberry et al., 2019). This might be related to the continuous flow of genes between *Xanthomonas* related to various plant hosts, which may

result in the appearance of new strains of pathogens with the potential to affect other hosts (Newberry et al., 2019). In this study, we only identified *Xanthomonas* species infecting pepper plants and identified them as the bacterial spot causative agents, but evolutionary changes or gene transmission that may led to *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*) attacking the pepper crop were not assessed. Pathogenicity test results demonstrated that all *X. euvesicatoria* strains isolated from pepper plants indeed infected pepper, as previously reported (Jones et al., 2004; Newberry et al., 2019).

Our main objective when analyzing severity by cluster was to group the 43 isolates upon their potential bacterial spot virulence (high, medium, and low), in order to select those from different virulence group to evaluate their susceptibility to antimicrobial agents commonly used in the studied area. This is important from an epidemiological point of view, since pepper is one of the most important crops in Chihuahua, México with a production of 676,463 tons a year (SIAP, 2018). The presence of *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*) in jalapeño pepper plants in South Central Chihuahua, might be due to importation of contaminated seeds, which is a common mechanism for spreading this pathogen (Moura et al., 2020).

In this study, we selected the plate microdilution technique due to its data reproducibility and low cost, thus allowing more antibiotics evaluation with high sensitivity even at low concentrations (Wiegand, Hilpert & Hancock, 2008; Ramírez & Castaño, 2009). Microdilution was performed in three TSB media at pH ranging from 6.48 to 7.38.

In general, as the copper concentration increased, the pH decreased (Franklin et al., 2000). In fact, copper availability in complex culture media such as the one selected in this study, TSB, is affected at low pH values (Hasman et al., 2009). Since the pH values were close to normal (pH = 7), the probability that this physicochemical factor changed the copper availability and the susceptibility results is rather low. Indeed, since all values were close to normal, regardless of the antimicrobial agent and dilutions tested, this may indicate that TBS medium may function as a buffer.

Several studies on copper-resistance by bacterial spot-associated *Xanthomonas* in pepper and tomato have been reported (Carrillo-Fasio et al., 2001; Martin, Hamilton & Kopittke, 2004; Quezado-Duval et al., 2005; Abbasi et al., 2015; Carvalho et al., 2019; Roach et al., 2020; Valarmathi, 2020). In the present study, *Xanthomonas* isolates were resistant to copper-based compounds, since all grew at Cu concentrations as high as 640 µg/mL, which is six times higher than that considered as an indicator of copper-resistance (200 µg/mL) (Roach et al., 2020).

Taylor & Reeder (2020) studied the scale and diversity of managing crop recommended antibiotics based on the MICs and the crops and diseases/problems to be selected. They selected low and middle-income countries, grouped by WHO regions, using an international database, comprising over 400,000 records for eight years. Data analysis revealed that antibiotics recommendation and application crops were higher than expected. For instance, within America region (no USA), antibiotics are recommended in 33% of the analyzed countries, where oxytetracycline and gentamicin are mostly used. Out of the recommendations, antibiotic application was in 60% of the diseases/problems

where “bacteria” was the causal agent and where in 13% of the cases copper was recommended as well. Out of 10 crops, tomato was the second crop, whose antibiotic application was mostly recommended.

The extent of antibiotic use in crop production relies on that *Xanthomonas* isolates growth inhibition by the combination of copper and oxytetracycline is higher than that of Gen + Ox. This might be due to the synergism between chemical agents, which has been reported in other studies related to copper-resistance of pepper bacterial spot, showing *X. euvesicatoria* and *X. campestris* pv. *vesicatoria* susceptibility to copper compounds (De Aguiar et al., 2003; Areas et al., 2018).

Furthermore, all isolates showed oxytetracycline susceptibility to Gen + Ox and 47% were completely inhibited by Gen. Oxytetracycline resistance by isolates differs with that reported by Farfán, Benítez & Carvajal (2014), who found *Xanthomonas* sp. resistant to Ox at ≤ 25 $\mu\text{g/mL}$. However, Quezado-Duval et al. (2005) did not detect resistance of pepper bacterial spot-associated *X. euvesicatoria* (formally *X. perforans*) to this compound, which is commonly used to control peach and nectarine bacterial spot disease by *X. arboricola* pv. *pruni* (Sundin & Wang, 2018; Raman et al., 2020).

Resistance to gentamicin at 25 to 100 $\mu\text{g/mL}$ has been reported by *X. campestris* isolates from cabbage and beans (Rojas, Peña & Peña-Vera, 2019), however, none of the tested isolates in the present study showed resistance to gentamicin.

Within *Xanthomonas* strains, detection of *copLAB* genes indicated copper resistance (Behlau, Gochez & Jones, 2020). Previous studies showed that in culture medium, *copLAB* genes regulate copper accumulation through copper-binding proteins generation. This is the main resistance mechanism in *Xanthomonas*, where *copLAB* has been identified as an operon and the regulatory gene is *copL*, whereas *copA* and *copB* genes encode copper-binding proteins (Cooksey, 1994; Voloudakis, Reignier & Cooksey, 2005). In the present study, *Xanthomonas* strains amplified *copLAB* genes, which would explain their growth in medium containing 640 $\mu\text{g/mL}$ copper. Although the Xp3 strain did not present *copLAB* genes, it was tolerant to copper. Under environmental conditions, bacteria such as *Xanthomonas* may develop tolerance to copper under homeostasis as a result of the constant copper interaction, which is widely distributed in the environment (Brown, Rouch & Lee, 1992; Martínez-Bussenius, Navarro & Jerez, 2017).

CONCLUSIONS

Xanthomonas euvesicatoria (formerly *X. perforans*) might be considered as an emerging pathogen of pepper in Mexico, since isolates resulting in the highest bacterial spot severity against jalapeño pepper plants in this study were identified as copper-resistant isolates.

Among bacterial spot management strategies, alternative options to copper-based compounds must be evaluated in the Chihuahua state of the North region of Mexico. The use of appropriate antibiotic combinations and doses might be effective for the control of phytopathogenic bacteria such as *Xanthomonas*, avoiding bacterial resistance and producing low impact on the environment. Their potential to protect crops with targeted diagnostics and quickly assess to bacterial populations virulence will not only support management strategies, but also application for quarantine purposes.

ABBREVIATIONS LIST

CFU	colony forming units
Cu	copper
CuG	copper gluconate + citric acid
CuS	copper sulphate
Cu + Ox	oxytetracycline and copper oxychloride + oxytetracycline hydrochloride
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Gen + Ox	gentamicin + oxytetracycline hydrochloride
GenS	gentamicin sulphate
MIC	minimum inhibitory concentration
NA	nutrient agar
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
TE	Tris-EDTA
TSB	tryptone soy broth
YDC	yeast extract dextrose calcium carbonate agar medium
Xe	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>
Xp	<i>Xanthomonas perforans</i>

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This project was funded by a grant from the Laboratorio de Inmunología y Virología of Facultad de Ciencias Biológicas at Universidad Autónoma de Nuevo León. This research was also supported by the Sistema Nacional de Investigadores (SNI) of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt-México) to Patricia Tamez-Guerra (16614), Ma. Carmen E. Delgado-Gardea (72286), Ricardo Gomez-Flores (9942), Loreto Robles-Hernández (123206), and Rocío Infante-Ramírez (202902). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt-México): 16614, 72286, 9942, 123206 and 202902.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author Contributions

- Jared Hernández-Huerta conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Patricia Tamez-Guerra conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Ricardo Gomez-Flores conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Ma. Carmen E. Delgado-Gardea conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Margarita S. García-Madrid conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Loreto Robles-Hernández conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.
- Rocio Infante-Ramirez conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, and approved the final draft.

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

Raw data are available in the [Supplemental Files](#).

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.10913#supplemental-information>.

REFERENCES

- Abbasi PA, Khabbaz SE, Weselowski B, Zhang L. 2015. Occurrence of copper-resistant strains and a shift in *Xanthomonas* spp. causing tomato bacterial spot in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology* **61**(10):753–761 DOI [10.1139/cjm-2015-0228](https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0228).
- Areas MS, Gonçalves RM, Soman JM, Souza Filho RC, Gioria R, Da Silva Junior TAF, Maringoni AC. 2018. Resistance of *Xanthomonas euvesicatoria* strains from Brazilian pepper to copper and zinc sulfates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **90**:2375–2380 DOI [10.1590/0001-3765201720160413](https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160413).
- Bardakci F, Skibinski DOF. 1994. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* **73**(2):117–123 DOI [10.1038/hdy.1994.110](https://doi.org/10.1038/hdy.1994.110).
- Behlau F, Gochez AM, Jones JB. 2020. Diversity and copper resistance of *Xanthomonas* affecting citrus. *Tropical Plant Pathology* **45**(3):200–212 DOI [10.1007/s40858-020-00340-1](https://doi.org/10.1007/s40858-020-00340-1).

- Behlau F, Hong JC, Jones JB, Graham JH. 2013. Evidence for acquisition of copper resistance genes from different sources in citrus-associated *Xanthomonas*. *Phytopathology* 103(5):409–418 DOI 10.1094/PHYTO-06-12-0134-R.
- Brown NL, Rouch DA, Lee BT. 1992. Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 27(1):41–51 DOI 10.1016/0147-619X(92)90005-U.
- Carrillo-Fasio JA, García-Estrada RS, Allende Molar R, Márquez-Zequera I, Millán-Ocampo S, Gaxiola-Espinoza G. 2001. Sensibilidad a cobre de cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye, en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:72–77.
- Carvalho R, Duman K, Jones JB, Paret ML. 2019. Bactericidal activity of copper zinc hybrid nanoparticles on copper tolerant *Xanthomonas perforans*. *Scientific Reports* 9(1):1–9 DOI 10.1038/s41598-018-37186-2.
- Chávez-Dozal A, Morales-Morales HA, Sanogo S, Segovia-Lerma A, Smith GB. 2012. Antibacterial activity of Mexican oregano essential oil (*Lippia berlandieri*) against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas euvesicatoria*. *Medio Ambiente y Desarrollo sustentable* 8:109–121.
- Constantin EC, Cleenwerck I, Maes M, Baeyen S, Van Malderghem C, De Vos P, Cottyn B. 2016. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. *Plant Pathology* 65(5):792–806 DOI 10.1111/ppa.12461.
- Cooksey DA. 1994. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 14:381–386 DOI 10.1111/j.1574-6976.1994.tb00112.x.
- De Aguiar LA, Kimura O, Castilho AMC, Castilho KSC, Ribeiro R, Akiba F, Do Carmo MGF. 2003. Effect of copper formulations on resident *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* populations on sweet pepper leaf surfaces. *Horticultura Brasileira* 21(1):44–50 DOI 10.1590/S0102-05362003000100009.
- European, Mediterranean Plant Protection Organization. 2013. PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*), causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. *EPPO Bulletin* 43(1):7–20 DOI 10.1111/epp.12018.
- Farfán LM, Benítez SV, Carvajal LMH. 2014. Sensibilidad de bacterias procedentes de pasifloras a antibióticos y productos cúpricos. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 8(1):20–33 DOI 10.17584/rcch.2014v8i1.2797.
- Franklin NM, Stauber JL, Markich SJ, Lim RP. 2000. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology* 48(2–3):275–289 DOI 10.1016/S0166-445X(99)00042-9.
- Griffin K, Gambley C, Brown P, Li Y. 2017. Copper tolerance in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper: a systematic literature review. *Crop Protection* 96:144–150 DOI 10.1016/j.cropro.2017.02.008.
- Guigón-López C, González-González P. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum*) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49–56.
- Hamza A, Robene-Soustrade I, Jouen E, Gagnevin L, Lefeuvre P, Chiroleu F, Pruvost O. 2010. Genetic and pathological diversity among *Xanthomonas* strains responsible for bacterial spot on tomato and pepper in the southwest Indian Ocean region. *Plant Disease* 94(8):993–999 DOI 10.1094/PDIS-94-8-0993.

- Hasman H, Bjerrum MJ, Christiansen LE, Hansen HCB, Aarestrup FM. 2009. The effect of pH and storage on copper speciation and bacterial growth in complex growth media. *Journal of Microbiological Methods* 78(1):20–24 DOI 10.1016/j.mimet.2009.03.008.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE, Schaad NW. 2004. Reclassification of the Xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic and Applied Microbiology* 27(6):755–762 DOI 10.1078/0723202042369884.
- Keinath AP. 2019. Controlling bacterial spot on tomato and pepper. Available at <http://lgpress.clemson.edu/publication/controlling-bacterial-spot-on-tomato-and-pepper> (accessed 7 December 2020).
- Koenraad H, Van Betteray B, Germain R, Hiddink G, Jones JB, Oosterhof J. 2009. Development of specific primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. In: Saygili H, Sahin F, Aysan Y, eds. *II International Symposium on Tomato Diseases*. 99–102.
- Martin HL, Hamilton VA, Kopittke RA. 2004. Copper tolerance in Australian populations of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* contributes to poor field control of bacterial spot of pepper. *Plant Disease* 88(9):921–924 DOI 10.1094/PDIS.2004.88.9.921.
- Martínez-Bussenius C, Navarro CA, Jerez CA. 2017. Microbial copper resistance: importance in biohydrometallurgy. *Microbial Biotechnology* 10(2):279–295 DOI 10.1111/1751-7915.12450.
- Mbega ER, Mabagala RB, Adriko J, Lund OS, Wulff EG, Mortensen CN. 2012. Five species of Xanthomonads associated with bacterial leaf spot symptoms in tomato from Tanzania. *Plant Disease* 96(5):760 DOI 10.1094/PDIS-01-12-0105-PDN.
- Morinière L, Burlet A, Rosenthal ER, Nesme X, Portier P, Bull CT, Lavire C, Fischer-Le Saux M, Bertolla F. 2020. Clarifying the taxonomy of the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce through a polyphasic approach reveals that *Xanthomonas cynarae* Trébaol et al. 2000 emend. Timilsina et al. 2019 is a later heterotypic synonym of *Xanthomonas hortorum* Vauterin et al. 1995. *Systematic and Applied Microbiology* 43(4):126087 DOI 10.1016/j.syapm.2020.126087.
- Moura DR, Yamada JK, De Albuquerque LC, De Carvalho-Pontes N. 2020. Crop rotation reduces the density of volunteer plants in processing tomato fields and the inoculum of bacterial spot. *European Journal of Plant Pathology* 156(1):299–304 DOI 10.1007/s10658-019-01868-y.
- Newberry EA, Bhandari R, Minsavage GV, Timilsina S, Jibrin MO, Kemble J, Sikora EJ, Jones JB, Potnis N. 2019. Independent evolution with the gene flux originating from multiple *Xanthomonas* species explains genomic heterogeneity in *Xanthomonas perforans*. *Applied and Environmental Microbiology* 85(20):e00885-19 DOI 10.1128/AEM.00885-19.
- Patrignani A, Ochsner TE. 2015. Canopeo: a powerful new tool for measuring fractional green canopy cover. *Agronomy Journal* 107(6):2312–2320 DOI 10.2134/agronj15.0150.
- Potnis N, Timilsina S, Strayer A, Shantharaj D, Barak JD, Paret ML, Vallad GE, Jones JB. 2015. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology* 16(9):907–920 DOI 10.1111/mpp.12244.
- Quezado-Duval AM, Leite RP Jr, Lopes CA, Lima MF, Camargo LEA. 2005. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil, Orlando, FL. In: Momol MT, Ji P, Jones JB, eds. *International Symposium on Tomato Diseases* 695:101–108.
- Raman NM, Easwaran M, Kaul R, Bharti J, Motelb KFA, Kaul T. 2020. Antimicrobial resistance with special emphasis on pathogens in agriculture. In: Kumar Y, ed. *Antimicrobial Resistance*. Intech Open.
- Ramírez L, Castaño D. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* 42:263–268.

- Roach R, Mann R, Gambley CG, Shivas RG, Chapman T, Rodoni B. 2020. Pathogenicity and copper tolerance in Australian *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot. *Crop Protection* 127(10):104923 DOI 10.1016/j.cropro.2019.104923.
- Robles-Hernández L, Ojeda-Barrios D, González-Franco A, Hernández-Huerta J, Salas-Salazar N, Hernández-Rodríguez OA. 2017. Susceptibilidad de aislados de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* a *Streptomyces* y extractos bioactivos de *Ganoderma*. *Acta Universitaria* 27(6):30–39 DOI 10.15174/au.2017.1417.
- Rojas M, Peña M, Peña-Vera MJ. 2019. Characterization and determination of antimicrobial and metal resistant profiles of *Xanthomonas* strains isolated from natural environments. *Journal of Analytical and Pharmaceutical Research* 8(2):55–60 DOI 10.15406/japlr.2019.08.00312.
- Shaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria*. Saint Paul: American Phytopathological Society (APS Press), 373.
- Sharma S, Bhattarai K. 2019. Progress in developing bacterial spot resistance in tomato. *Agronomy* 9(1):26 DOI 10.3390/agronomy9010026.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Available at http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenDelegacion.do (accessed 7 December 2020).
- Strayer-Scherer A, Liao YY, Young M, Ritchie L, Vallad GE, Santra S, Freeman JH, Clark D, Jones JB, Paret ML. 2018. Advanced copper composites against copper-tolerant *Xanthomonas perforans* and tomato bacterial spot. *Phytopathology* 108(2):196–205 DOI 10.1094/PHYTO-06-17-0221-R.
- Sundin GW, Wang N. 2018. Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 56(1):161–180 DOI 10.1146/annurev-phyto-080417-045946.
- Taylor P, Reeder R. 2020. Antibiotic use on crops in low and middle-income countries based on recommendations made by agricultural advisors. *CABI Agriculture and Bioscience* 1(1):1–14 DOI 10.1186/s43170-020-00001-y.
- Timilsina S, Jibrin MO, Potnis N, Minsavage GV, Kebede M, Schwartz A, Bart R, Staskawicz B, Boyer C, Vallad GE, Pruvost O, Jones JB, Goss EM. 2015. Multilocus sequence analysis of xanthomonads causing bacterial spot of tomato and pepper plants reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. *Applied and Environmental Microbiology* 81(4):1520–1529 DOI 10.1128/AEM.03000-14.
- Valarmathi P. 2020. Antibiotics-miracle drugs as crop protectants: a review. *Agricultural Reviews* 41:43–50 DOI 10.18805/ag.R-1941.
- Voloudakis AE, Reignier TM, Cooksey DA. 2005. Regulation of resistance to copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(2):782–789 DOI 10.1128/AEM.71.2.782-789.2005.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3(2):163–175 DOI 10.1038/nprot.2007.521.
- Zhang Y, Mao R, Zheng J, Xiao Y, Tang M, Quan J. 2013. Laboratory bioassay and field evaluation of copper gluconate as a new potential bactericide against *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Hase) dye. *Journal of Agricultural Science* 5(12):23 DOI 10.5539/jas.v5n12p23.